

# **Untersuchungen zur Rolle von beta2-Syntrophin in Adipozyten**



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE  
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von  
Sabrina Bauer aus Schwandorf  
im Mai 2012

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2009 bis Mai 2012 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 16.05.2012

Kolloquium am 28.09.2012

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Wirth
	Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler
	Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Charalampos Aslanidis
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Gernot Längst

---

**Inhaltsverzeichnis**

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung und Aufbau des Fettgewebes	1
1.1.1	Mesenchymale Stammzellen als Vorläuferzellen	1
1.1.2	Adipogenese	2
1.1.3	Lipidtropfen	4
1.1.3.1	Caveolin-1	4
1.1.3.2	Perilipin	5
1.1.4	Lipolyse	5
1.2	Das Fettgewebe	6
1.2.1	Formen des Fettgewebes	6
1.2.2	Metabolische und endokrine Rolle des Fettgewebes	7
1.2.3	Pathophysiologische Veränderungen des Fettgewebes – Adipositas	7
1.3	Beta2-syntrophin	8
1.3.1	Struktur und Funktionen der Syntrophine	8
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Kit-Systeme	17
2.1.5	Antikörper	18
2.1.5.1	Primäre Antikörper	18
2.1.5.2	Sekundäre Antikörper	19
2.1.6	Oligonukleotide	19
2.1.6.1	Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner Gene	19
2.1.7	siRNAs	20
2.1.8	Puffer und Lösungen	21
2.1.8.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA	21
2.1.8.2	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	22

---

2.1.8.2.1	Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten	22
2.1.8.2.2	Lösungen für SDS-PAGE	23
2.1.8.2.3	Lösungen für Western-Blotting	24
2.1.8.2.4	Antikörperlösungen	25
2.1.8.2.5	Lösungen für ELISAs	25
2.1.8.2.6	Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen	26
2.1.8.3	Lösungen für Oil Red O Färbung	27
2.1.8.4	Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung	27
2.1.8.5	Lösungen für Immunhistochemiefärbung	28
2.1.8.6	Puffer zur Adipozytenisolierung	29
2.1.8.7	Lösungen für Fettsäurestimulationen	29
2.1.9	Medien für murine Fibroblastenzellen	30
2.1.9.1	Kultivierungsmedium	30
2.1.9.2	Differenzierungsmedium	31
2.1.10	Medien für primäre Adipozyten	31
2.1.10.1	Kultivierungsmedium	31
2.1.10.2	Differenzierungsmedium	32
2.1.11	Organismen	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Kultivierung von Zellen	33
2.2.1.1	Kultivierung der Fibroblastenzelllinie 3T3-L1	33
2.2.1.2	Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten	33
2.2.1.3	Differenzierung von primären humanen Adipozyten	34
2.2.1.4	RNA-Interferenz	34
2.2.1.4.1	Transfektion der Präadipozyten	34
2.2.1.4.2	Transfektion reifer Adipozyten	35
2.2.1.5	Stimulationsversuche	36
2.2.1.5.1	Inkubation mit Fettsäuren	36
2.2.1.5.2	Stimulation mit Epinephrin	36
2.2.1.5.3	Cholesterindepletion	36
2.2.1.6	Bestimmung des Zelltodes	37
2.2.1.6.1	Zytotoxizität	37
2.2.1.6.2	Apoptose	37
2.2.1.7	Bestimmung der Viabilität	37



---

2.2.1.7.1	Auszählung der vitalen Zellen	37
2.2.1.7.2	CTB Zellviabilitätsassay	38
2.2.2	Arbeiten mit DNA	38
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	38
2.2.2.2	Agarosegelelektrophorese	38
2.2.2.3	Real-Time PCR	39
2.2.2.4	Aufreinigung und Sequenzierung von DNA	40
2.2.3	Arbeiten mit RNA	41
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	41
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	41
2.2.3.3	Reverse Transkription	41
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	42
2.2.4.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	42
2.2.4.2	Präparation von Fettgewebsextrakten	42
2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.4.5	Coomassie-Färbung	44
2.2.4.6	Silber-Färbung	44
2.2.4.7	Western-Blotting	44
2.2.4.8	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
2.2.4.8.1	cAMP ELISA	46
2.2.5	Oil Red O Färbung	46
2.2.6	Immunfluoreszenz	46
2.2.7	Histologische Untersuchungen	47
2.2.7.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	47
2.2.7.2	Sirius-Red-Färbung	47
2.2.7.3	Immunhistochemie	48
2.2.8	Bestimmung von Triglyzeriden in Seren und Zell- und Gewebslysaten	49
2.2.9	Bestimmung von Cholesterin in Seren und Zell- und Gewebslysaten	49
2.2.10	Bestimmung von freien Fettsäuren in Seren und Zellüberständen	49
2.2.11	Bestimmung von freiem Glyzerin in Seren und Zellüberständen	50
2.2.12	Bestimmung von Glukose in Seren	50
2.2.13	Koimmunpräzipitation	50
2.2.14	Adipozytenisolierung	51

---

2.2.15	Fettgewebsskulturen	51
2.2.16	Tiermodelle	51
2.2.16.1	Syntrophin Knock-out Mäuse	52
2.2.16.2	Intraperitonealer Glukose- und Insulintoleranztest	52
2.2.16.3	Intraperitonealer Insulininjektion	52
2.2.16.4	Postprandiale Untersuchungen	52
2.2.16.5	ob/ob Mäuse	53
2.2.16.6	Wildtyp C57BL/6 Mäuse	53
2.2.17	Quantifizierung der Immunoblotexperimente	53
2.2.18	Statistische Auswertungen	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	SNTB2 Expression in murinen Adipozyten	55
3.2	Expression und Funktion von SNTB2 in 3T3-L1 Zellen	56
3.2.1	Lokalisation von SNTB2 in 3T3-L1 Fibroblasten	57
3.2.2	Funktion von SNTB2 3T3-L1 Fibroblasten	59
3.2.3	Lokalisation und Funktion von SNTB2 in 3T3-L1 Adipozyten	61
3.3	SNTB2 Knockdown in primären humanen Adipozyten	62
3.4	Morphologie der Zellen – Ausbildung großer Lipidtropfen	63
3.4.1	FAS Knockdown	63
3.4.2	Cholesterindepletion	65
3.4.3	SREBP2 Knockdown	68
3.5	Speicherung von freien Fettsäuren und Lipolyse	69
3.5.1	Knockdown von SNTB2 während der Adipogenese	69
3.5.2	Knockdown von SNTB2 in reifen Zellen	72
3.6	Identifizierung von Interaktionspartnern	74
3.6.1	Utrophin Knockdown	74
3.6.2	Caveolin-1 Knockdown	76
3.7	Metabolische Charakterisierung der SNTB2 defizienten Mäuse	79
3.7.1	Gewicht und Serumparameter	79
3.7.2	Insulinwirkung und Glukosetoleranz	81
3.7.3	Analyse der Fettdepots	84
3.7.3.1	Morphologie der Fettdepots	84
3.7.3.2	Lipidspeicherung und –freisetzung	87
3.7.3.2.1	Gespeicherter Lipidgehalt	87

---

3.7.3.2.2	Lipogene Enzyme und Lipasen	88
3.7.3.2.3	Cholesterinverteilung	91
3.7.3.3	Entzündungsreaktion im Fettgewebe	94
3.7.4	Veränderungen in der Leber	96
3.7.4.1	Gespeicherte Lipide	96
3.7.4.2	Cholesterinverteilung in der Leber	97
3.7.4.3	Glukoneogenese, Fettsäuresynthese und Glukoseaufnahme	100
3.7.4.4	Entzündung und Fibrose in der Leber	101
3.8	ob/ob Mäusen	102
3.8.1	Gewichtsunterschiede und Serumparameter	102
3.8.2	Im Fettgewebe gespeicherte Lipide	103
3.8.3	SNTB2 und Caveolin-1 im Fettgewebe	104
3.8.4	Analyse der Lebern der ob/ob Mäuse	107
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>110</b>
4.1	Expression und Lokalisation von SNTB2 in Fibroblasten und Adipozyten	110
4.2	Die Rolle von SNTB2 für die Funktionalität von Adipozyten	112
4.2.1	Adipozytenhypertrophie und Hyperplasie	112
4.2.2	Metabolische Konsequenzen der Adipozytenhypertrophie	112
4.2.3	Regulation der Cholesterinhomeostase	114
4.2.4	SNTB2 beeinflusst die Adipogenese	115
4.3	Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SNTB2	117
4.3.1	Komplexbildung mit Utrophin	118
4.3.2	Caveolin-1 als neuer Interaktionspartner von SNTB2 in Adipozyten	119
4.3.2.1	Caveolin-1 in den Lebern der SNTB2 -/- Tiere	120
4.4	SNTB2 in der ob/ob Maus	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>125</b>
6.1	Publikationen	125
6.1.1	Erstautorenschaften	125
6.1.2	Koautorenschaften	126
6.2	Kongressbeiträge	128
6.2.1	Vorträge	128
6.2.2	Poster	129
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>



---

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb	Abbildung
ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
ADFP	Adipophilin
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
act	aktive Form
AK	Antikörper
AKT	Protein Kinase B
AM-1	Adipocyte Medium-1
Amp	Ampicillin
AMPK	Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase
Apm	Adiponectin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
$\alpha$ SMA	alpha Smooth Muscle Actin
AT	Adipose tissue
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary unit
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BAT	Braunes Fettgewebe
BCA	Bicinchoninsäure (-acid)
BODIPY	Boron-Dipyrrromethene
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CGI-58	Comparative Gene Identification-58
CIDEA	Death-Inducing DFFA-Like Effector A
Col1A1	Kollagen Typ I alpha 1
Cp	Crossing Point
CRP	C-Reactive Protein
CTB	Cell Titer Blue
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DM-2	Adipocyte Differentiation Medium-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium + Ham's F-12 Nutrient Mixture
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotid (N = A, T, G, C)
ECL	Enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EEA1	Early Endosome Antigen 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
epi	epididymal
Epi	Epinephrin
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
E <sub>x</sub>	Extinktion bei Wellenlänge x
FA/FFA	freie Fettsäuren
FS	Fettsäuren (Fatty Acid)
FABP4	Fatty Acid-Binding Protein 4
FAS	Fatty Acid Synthase
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FSP27	Fat-Specific Protein 27
G6PDH	Glukose-6-phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukose Transporter 4
GTPase	kleines GTP-bindendes Protein
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	Hochfettdiät
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA
HRP	Meerrettichperoxidase
HSL	Hormone-sensitive Lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
ICA512	Islet Cell Autoantigen 512
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
ip	intraperitoneal
IPGTT	intraperitoneal Glukose Toleranz Test
IPITT	intraperitoneal Insulin Toleranz Test
IR	Insulin Rezeptor
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LA	Linolsäure
LAMP1	Lysosome-Associated Membrane Protein 1
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lova	Lovastatin
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger RNA
MCS	Mesenchymale Stammzellen
Meva	Mevalonat
MGL	Monoacylglycerol Lipase
min	Minute
NCS	Newborn Calf Serum
mRNA	messenger RNA

---

nNOS	neuronale Stickoxid Synthase
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OA	Ölsäure
OD	optische Dichte
PA	Palmitinsäure
pAK	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
panSNT	pan Syntrophin
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PBST	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline) mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
Pen	Penicillin
PDZ	PSD-95/Disc-Large/ZO-1
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ Coactivator 1 alpha
PH	Pleckstrin Homology
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PLIN	Perilipin
PM-1	Preadipocyte Medium-1
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PRDM16	PR Domain-Containing Protein 16
pre	Vorläuferform
Pref-1	Preadipocyte Factor-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ren	perirenal
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sc	subkutan
SCD-1	Stearoyl-CoA Desaturase-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	Small Interfering RNA
SNT	Syntrophin
SNTB2	$\beta$ 2-Syntrophin
SNTB2 -/-	$\beta$ 2-Syntrophin Knockout
SOD2	Mitochondriale Superoxiddismutase-2
SREBP	Sterol regulatory Element-Binding Transcription Factor
Strep	Streptomycin
SU	Syntrophin Unique
SVF	stroma-vaskuläre Fraktion
T2D	Typ 2 Diabetes Mellitus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Trispuffer (Tris Buffered Saline)

---

TBST	Trispuffer (Tris Buffered Saline) mit Tween
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyldiamin
TG	Triglyzeride
TIP47	Tail-Interacing Protein of 47 kDa
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl-) aminomethan
U	Unit
UCP-1	Uncoupling Protein-1
uni	Univers
UV	Ultraviolet
V	Volumen
WAT	Weißes Fettgewebe
vis	viszeral
WT	Wildtyp



# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung und Aufbau des Fettgewebes

### 1.1.1 Mesenchymale Stammzellen als Vorläuferzellen

Während der gesamten Lebenszeit ist das weiße Fettgewebe in der Lage zu expandieren und die durch die Nahrung zugeführte, nicht benötigte Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern. Dies wird durch eine Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie) und der Zellvolumina (Hypertrophie) der Adipozyten bewerkstelligt [1]. Einige Studien zeigen, dass sich zudem etwa 10 % der Fettzellen des Körpers jedes Jahr erneuern [2]. Allerdings sind reife Adipozyten postmitotisch, können sich also nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilen. Um die Expansion und Erneuerung des Fettgewebes zu gewährleisten, können proliferierende Vorläuferzellen zu Adipozyten differenzieren [3-4].

Den Ursprung von Adipozyten machen mesenchymale Stammzellen (MSC) aus, welche ein pluripotentes Differenzierungspotential aufweisen [5]. Diese Vorläuferzellen können, neben der Differenzierung zu Adipozyten, zu unterschiedlichen Gewebszellen, wie Osteoblasten, Chondrozyten und Myozyten [6-7] reifen. Entscheidend für die Festlegung der Stammzellen auf eine bestimmte Entwicklung sind entsprechende Differenzierungssignale [8]. In Abbildung 1 ist ein Modell für die Entwicklung von Adipozyten aus MSC dargestellt.

Die Transkriptionsfaktoren Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) und CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs) lenken die Differenzierung in Richtung der weißen Adipozyten. Braune Adipozyten, die vor allem der Erzeugung von Wärme dienen, und weiße Adipozyten stammen nicht von denselben Vorläuferzellen ab [9]. Braune Fettzellen entwickeln sich aus Myogenic Factor 5 (Myf5)-exprimierenden Vorläuferzellen, welche auch zu Muskelzellen differenzieren können. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PR Domain-Containing Protein 16 (PRDM16) bewirkt, dass diese Zellen zu braunen Fettzellen reifen [10]. Zwar teilen braune und weiße Adipozyten nicht dieselben Vorläuferzellen, allerdings können diese Zellen transdifferenzieren. Sie können also einen phänotypischen Wechsel, von braunen zu weißen Adipozyten und umgekehrt, vollführen [11]. Neben PRDM16 regulieren auch andere Proteine, wie Uncoupling Protein-1 (UCP-1), Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A (CIDEA), PPAR $\gamma$  Coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) und weitere die Transdifferenzierung.

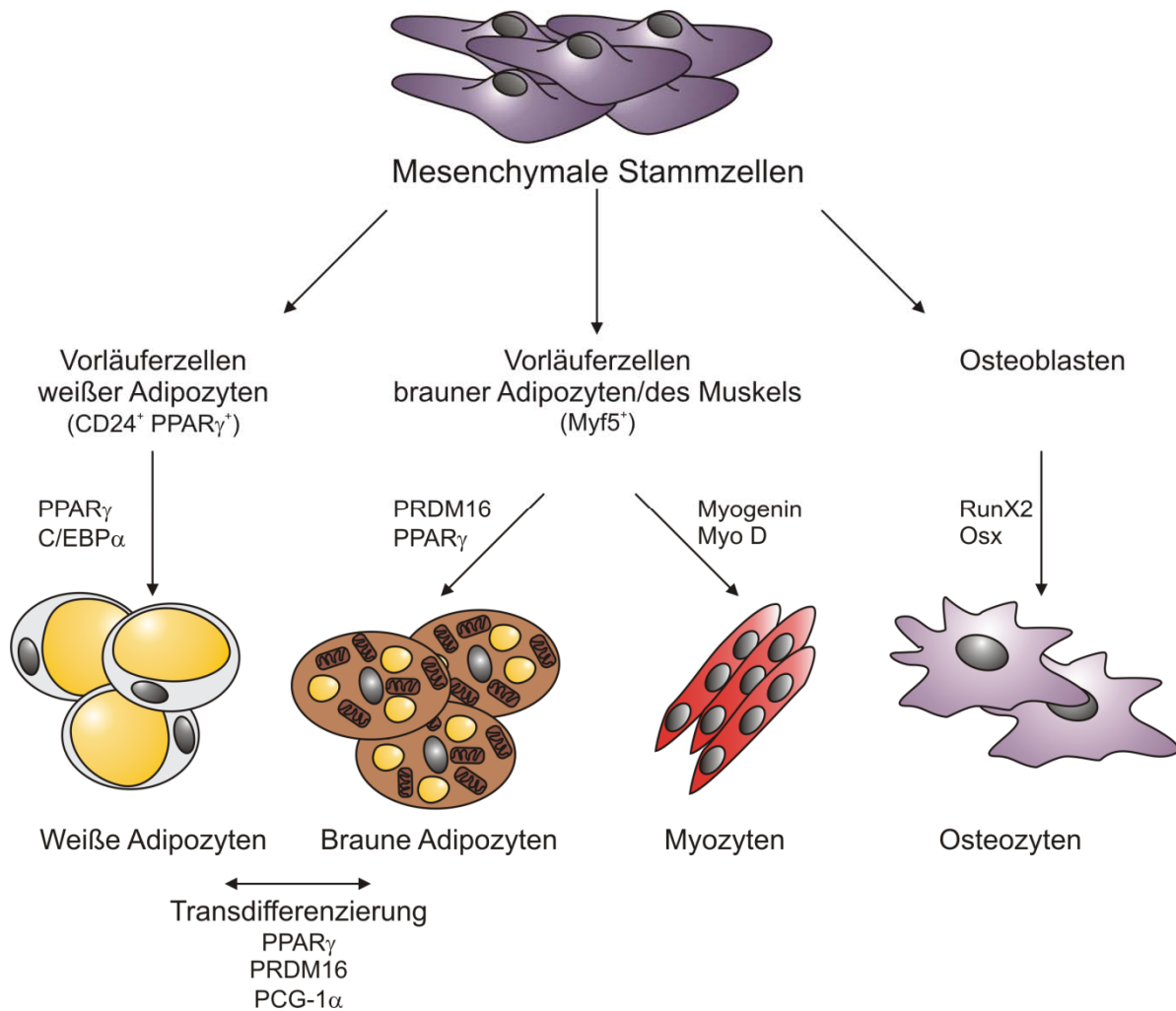


Abbildung 1: Modell der Entwicklung von weißen und braunen Adipozyten (nach [8]). Vorläuferzellen von Adipozyten, Osteoblasten und Myozyten sind mesenchymale Stammzellen. Je nach Differenzierungssignal legen sich die Stammzellen auf eine bestimmte Entwicklung fest.

### 1.1.2 Adipogenese

Die Festlegung der MSC sich zu Adipozyten zu entwickeln, schließt die Differenzierung in Zellen anderer Linien aus. Die Reifung von Adipozyten ist komplex reguliert und durchläuft nach der Determination die Phasen des Zellkontakts, der Mitose und klonalen Expansion, gefolgt von einem Wachstumsstopp und der Akkumulation von Lipiden (siehe Abbildung 2). Dabei entsteht als frühe Vorläuferzelle der Adipoblast, welcher sich zu einem noch teilungsfähigen Präadipozyten entwickelt. Schließlich prägt die Zelle den charakteristischen adipozytären Stoffwechsel aus und speichert vermehrt Lipide. Dieser Prozess der terminalen Differenzierung mündet zuletzt in der Ausbildung der typischen Morphologie eines Adipozyten [12].

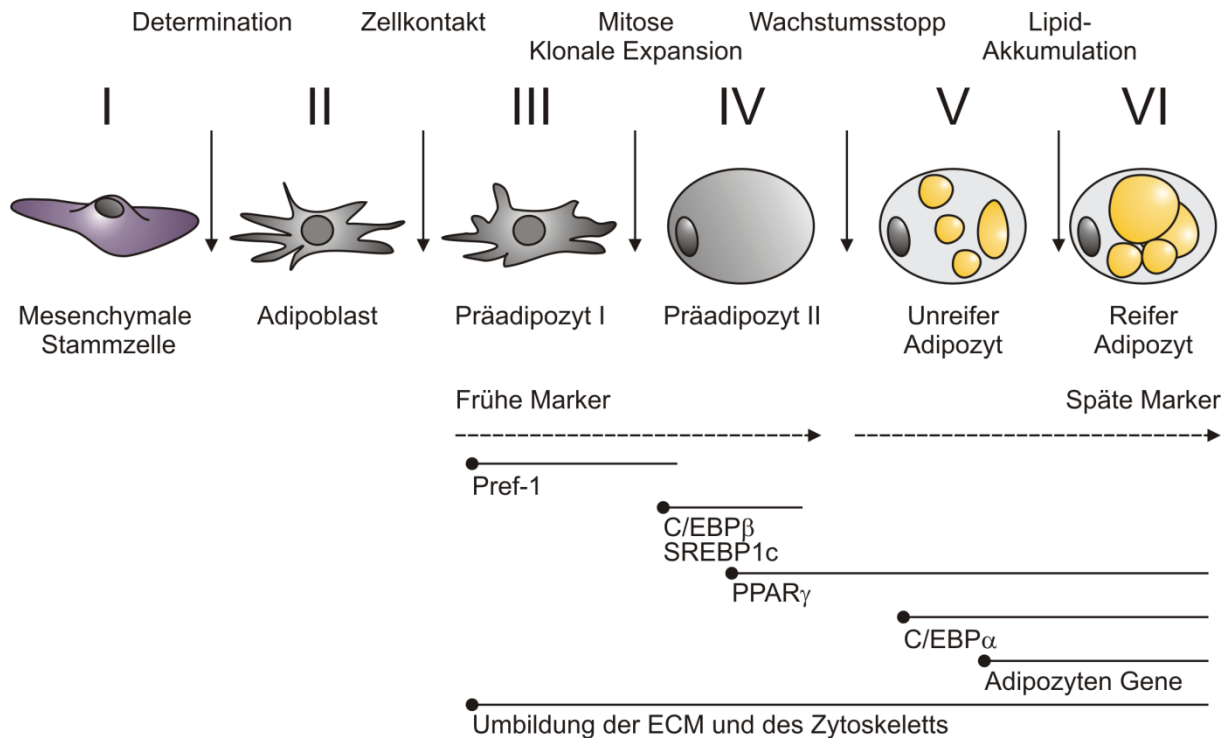


Abbildung 2: Die Stationen der Adipozyten-Differenzierung (nach [12-13]). EMC, Extrazelluläre Matrix.

Bei der Adipogenese wird zuerst die Expression von Preadipocyte Factor-1 (Pref-1) über verschiedene Mechanismen reduziert, da die lösliche Form von Pref-1 die Reifung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten hemmt [14]. In der frühen Phase der Adipogenese werden die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  aktiviert und vermitteln die Induktion von C/EBP $\alpha$ . Zusammen mit Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1c (SREBP1c) wird die Synthese von PPAR $\gamma$  Liganden erhöht [15], die zur Aktivierung von PPAR $\gamma$  beitragen [16]. PPAR $\gamma$  erhöht unter anderem die Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), die Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD-1), das Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4), Perilipin und Adiponektin [16].

Die Aktivierung von SREBP1c induziert die Fettsäure- und Phospholipidsynthese [17]. Unter anderem werden hierdurch Gene reguliert, welche die de novo Lipogenese beeinflussen, wie die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und die Fatty Acid Synthase (FAS). Auch die SCD-1 wird durch die Aktivierung von SREBP1c reguliert. SCD-1 wandelt gesättigte Fettsäuren in ihre einfach ungesättigte Form um, die für die Synthese von Triglyceriden und Cholesterinestern benötigt werden [18]. Die Lipide werden von den Adipozyten in den Lipidtröpfchen gespeichert.

### 1.1.3 Lipidtropfen

Lipidtropfen haben nicht nur die Funktion überschüssige Energie als Triglyzeride zu speichern, sondern sind metabolisch aktive Organellen, die an der Homeostase der Zelle beteiligt sind. Lipidtropfen bestehen aus einem Kern aus neutralen Lipiden, umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, unveresterten freiem Cholesterin und spezifischen Populationen von Lipidtropfen-assoziierten Proteinen [19-20]. Ob die Lipidtropfen im Endoplasmatischen Retikulum (ER), oder im Zytoplasma nahe dem ER gebildet werden, ist bisher nicht geklärt [20-21]. Die gegenwärtige Hypothese der Lipidtropfenbildung beschreibt, dass die Lipidtropfen durch Verschmelzung von neutralen Lipiden zu lamellären Schichten innerhalb des Bilayers des ER entstehen. Nach Erreichen einer bestimmten Größe schnüren sich die Lipidtropfen vom ER ins Zytoplasma ab [22-24]. An der Regulation der Größe und Biogenese der Lipidtropfen sind Proteine beteiligt, welche mit diesen Organellen assoziieren. Zu diesen Proteinen gehören Perilipin, Adipophilin, Tail-Interacting Protein of 47 kDa (TIP47), Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A (CIDEA/FSP27), Caveolin-1, S3-12 und OXPAT [19, 25-29].

#### 1.1.3.1 Caveolin-1

Caveolin-1 ist ein integrales Membranprotein und stellt das Hauptprotein der Caveolae dar. Caveolae sind Invaginationen der Plasmamembran [30] und machen im Fettgewebe 20 – 30 % der Oberfläche der Plasmamembran aus. Des Weiteren spielen Caveolae in verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Endo- und Transzytose, dem Cholesterin- und Lipidmetabolismus, Signalweiterleitung in der Zelle und der Aufnahme von freien Fettsäuren und dessen Umwandlung in Lipidtropfen, eine entscheidende Rolle [28, 31]. Caveolin-1 kann Cholesterin und Fettsäuren binden und assoziiert nach Beladung der Zellen mit Fettsäuren mit den Lipidtropfen [32]. Am Lipidtropfen kann Caveolin-1 die Vergößerung der Lipidtropfen durch Protein-Protein Interaktionen und Umgestaltung der Phospholipide auf der Oberfläche der Lipidtropfen unterstützen [28].

In der Regulation des Glukosemetabolismus spielt Caveolin-1 eine weitere wichtige Rolle. Direkte Interaktionen zwischen dem Insulin Rezeptor (IR) und Caveolin-1 sind entscheidend für die Stabilisierung des IR und dessen Schutz vor Degradation. Die Interaktion von Caveolin-1 und dem IR verstärkt die durch Insulin vermittelte Phosphorylierung des IR Substrates 1 (IRS-1) [33-34]. Die Signalwirkung des IR wird somit von Caveolin-1 beeinflusst. Auch an der Endozytose von Glukose Transporter 4 (GLUT4) ist Caveolin-1

beteiligt. Die Insulin-abhängige Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran führt zur Stimulation der Glukoseaufnahme in die Zelle [35]. Hier ist GLUT4 in den Caveolae lokalisiert.

### **1.1.3.2 Perilipin**

Perilipin ist das am Besten untersuchte Mitglied der Familie der PAT Proteine, genannt nach Perilipin, Adipophilin und TIP47. Für Perilipin charakteristisch sind 5 Konsensussequenzen, welche von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden können. Somit kann die Speicherung von Lipiden und die Lipolyse, je nach metabolischen Status der Zelle reguliert werden. Perilipin hat eine duale metabolische Funktion in der Zelle, indem es den Zugang der Lipasen an den Lipidtropfen reguliert [19]. Im basalen Zustand ist Perilipin mit dem Protein Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) assoziiert, welches einen Koaktivator der ATGL darstellt. Infolgedessen wird der Zugang der Hormone-Sensitive Lipase (HSL) zu den gespeicherten Triglyzeriden verhindert, die Lipolyse wird reduziert und der Lipidtropfen ist vor Abbau geschützt. Die Bindung von Katecholamin an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren führt so zum Anstieg des cAMP Spiegels und dadurch zur Aktivierung der PKA. Diese phosphoryliert sowohl Perilipin als auch die HSL. CGI-58 dissoziiert von dem phosphorylierten Perilipin ab und aktiviert die ATGL. Da Perilipin nicht mehr an CGI-58 gebunden ist, kann es die HSL an die Oberfläche des Lipidtropfens rekrutieren und die Lipolyse wird induziert [19, 36]. Nichtphosphoryliertes Perilipin bildet also eine Oberflächebarriere auf Lipidtropfen, welche die Triglyzeride vor Lipolyse schützt, während phosphoryliertes Perilipin die HSL zum Lipidtropfen rekrutiert und die Lipolyse verstärkt.

### **1.1.4 Lipolyse**

Lipolyse wird die Hydrolyse von primären und sekundären Esterverbindungen genannt, welche zwischen den langkettigen Fettsäuren und dem Glycerinrückgrat in den Triglyzeriden bestehen. Spezielle Hydrolasen, die Lipasen, regulieren den Abbau der Triglyzeride [37]. In drei Schritten und mittels dreier Lipasen, der ATGL, der HSL und der Monoacylglycerol Lipase (MGL), kann die Hydrolyse von Triglyzeriden zu freien Fettsäuren und Glycerin ausgeführt werden. Die ATGL vollzieht den ersten Schritt des Abbaus, indem Triglyzeride zu Diglyzeriden und freien Fettsäuren (FA) gespalten werden [38]. Erst durch die Bindung an das Koaktivatorprotein CGI-58 kann die ATGL ihre vollständige Hydrolaseaktivität entfalten.

Die HSL ist ein Enzym mit mehreren Funktionen. Diese Lipase ist in der Lage verschiedene Acylester zu hydrolysieren, wie Triglyzeride, Diglyzeride und Monoglyzeride [39-40]. Die Phosphorylierung der HSL und die Bindung an Perilipin, führen zur Translokation der HSL an den Lipidtropfen und somit zur Induktion der Lipolyse. Die MGL katalysiert die Hydrolyse der letzten Fettsäure in NEFAs und Glycerin [41]. In Abbildung 3 sind die Schritte der Lipolyse zusammengefasst.

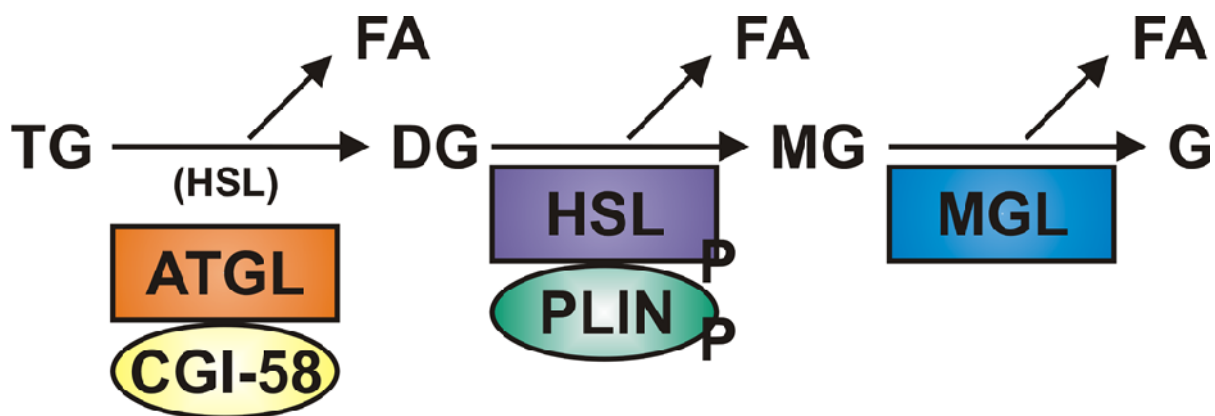


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Abbaus der Triglyzeride mit den beteiligten Enzymen (nach [37, 42]). TG, Triglyzeride; DG, Diglyzeride; MG, Monoglyzeride; FA, freie Fettsäuren; G, Glycerin; PLIN, Perilipin.

## 1.2 Das Fettgewebe

### 1.2.1 Formen des Fettgewebes

Das Fettgewebe umfasst zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Arten, das braune und das weiße Fettgewebe. Braunes Fettgewebe ist auf die Regulation der Körpertemperatur spezialisiert. In der Thermogenese kann durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung Hitze anstatt ATP gebildet werden. Dieser Mechanismus wird über UCP-1 vermittelt [43]. Weißes Fettgewebe ist in der Lage Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern und bei Bedarf freie Fettsäuren freizusetzen [44]. Weißes Fettgewebe ist über den ganzen Körper verteilt und hier wird hauptsächlich zwischen subkutanem und intra-abdominalem (viszeralem) Fettgewebe unterschieden [45]. Das subkutane Fettdepot beinhaltet das Fettgewebe unter der Haut, vor allem im Gesäß, den Schenkeln, im Abdomen, Gesicht und Nacken, während das viszerale Fettgewebe das mesenteriale, omentale und retroperitoneale Fett einschließt [36, 46]. Mechanisches Fett oder

Strukturfett spielt im Wesentlichen eine protektive Rolle und befindet sich in retro-orbitalen Bereichen, in den Handflächen und Füßen.

### **1.2.2 Metabolische und endokrine Rolle des Fettgewebes**

Das Fettgewebe ist an der Speicherung von Lipiden nach Mahlzeiten und an der Freisetzung von freien Fettsäuren und Glyzerin in der postabsorptiven Phase (Nüchternzustand), um benötigte Energie zu liefern, beteiligt. In der Tat speichert das Fettgewebe Energie in metabolisch sicherer Form und agiert so als eine Art dynamischer Puffer, der den Lipid-Fluss in der postprandialen Phase reguliert [47]. Des Weiteren wurde die Rolle des Fettgewebes in zahlreichen physiologischen Prozessen aufgezeigt. Das Fettgewebe beeinflusst den Blutdruck, die Immunität und die Insulinsensitivität. Adipozyten produzieren eine Reihe von hormonellen Faktoren, den Adipokinen wie Leptin, Chemerin und Adiponektin, welches die Insulinsensitivität verbessert [48-49]. Auch nicht-adipozytäre Zellen sind Bestandteil des Fettgewebes. Neben reifen Adipozyten und deren Vorläuferzellen finden sich auch mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, Blutgefäße, Nervenfasern und Zellen des Immunsystems im Fettgewebe [50]. Diese nicht-adipozytären Zellen werden in ihrer Gesamtheit als stroma-vaskuläre Zellfraktion bezeichnet und können bis zu 50 % der Zellen im Fettgewebe betragen [51]. Fett-residente Makrophagen produzieren Chemokine und Zytokine und beeinflussen somit unter anderem die Insulinsensitivität. Allerdings zeichnen sich die Makrophagen im Fettgewebe unter physiologischen Bedingungen durch einen antiinflammatorischen Phänotyp aus [52].

### **1.2.3 Pathophysiologische Veränderungen des Fettgewebes – Adipositas**

Eine übermäßige Expansion des Fettgewebes ist mit metabolischen Veränderungen assoziiert und resultiert aus Hyperplasie und Hypertrophie der Adipozyten. Vor allem eine exzessive Anhäufung des viszeralen Fettgewebes ist schädlich. Die mit der Adipositas einhergehende Insulinresistenz ist zum Teil eine Folge der vermehrten Sekretion von freien Fettsäuren der viszeralen Adipozyten und der veränderten Produktion von Adipokinen und Zytokinen [53]. Aktivierte Makrophagen, welche nun einen pro-inflammatorischen Phänotyp ausbilden, dringen ins vergrößerte Fettgewebe ein und bringen vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine hervor [52, 54]. Die inadequate Speicherung von Lipiden im Fettgewebe und die damit verbundene Dysfunktion resultiert zudem in einer vermehrten Ablagerung von

Fettsäure-Derivaten in peripheren Geweben. Diese Derivate überfordern die oxidative Kapazität der Zellen und aktivieren Stresskinasen wodurch eine Insulinresistenz in den Organen entsteht [53, 55-57].

Adipozyten, die übermäßig Lipide speichern werden hypertroph und weisen einen verringerten Cholesterin- und Phospholipidgehalt der Plasmamembran auf. Der Transkriptionsfaktor SREBP2 wird bei reduzierten endogenen Cholesterinkonzentrationen über proteolytische Spaltung aktiviert und liegt als Folge in hypertrophen Adipozyten vermehrt in seiner aktiven Form vor [58-59]. Cholesterin ist ein entscheidendes Element und für die Ausbildung von Mikrodomänen, wie Caveolae, welche der IR und adrenerge Rezeptoren zur Signalübertragung benötigen, wichtig. Dies könnte wesentlich zur Dysfunktion der hypertrophen Adipozyten beitragen [60].

### **1.3 Beta2-syntrophin**

#### **1.3.1 Struktur und Funktionen der Syntrophine**

Die Familie der Syntrophine besteht aus fünf Isoformen –  $\alpha$ -Syntrophin,  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Syntrophin (SNTB2) und  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-Syntrophin – welche alle denselben modularen Aufbau teilen. Die N-terminale Region beinhaltet eine PDZ (PSD-95/Disc-large/Zona-Occludens-1) Domäne, welche in eine Pleckstrin Homologie (PH1) Domäne eingebettet ist. Die C-terminale Hälfte umfasst eine zweite PH Domäne (PH2) und die hochkonservierte Syntrophin Unique (SU) Region [61-62]. In Abbildung 4 A ist die Organisation der Domänen aufgezeigt. PDZ Domänen binden oft an PDZ-Konsensus-Sequenzen am C-Terminus von Rezeptoren [63], oder können mit einer zweiten PDZ Domäne interagieren. Signalproteine und Proteine des Zytoskeletts beinhalten häufig PH Regionen, welche Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen vermitteln. Die Bindung der PH Domäne an Proteine und Phosphatidylinositol kann die Signalweiterleitung beeinflussen [64-65].

Erstmals wurden die Syntrophine im Skelettmuskel beschrieben. Hier sind sie Bestandteil eines Komplexes an Proteinen, welcher mit Dystrophin assoziiert [66]. Mutationen im Dystrophin-Gen sind die genetische Ursache der X-chromosomal vererbten Muskeldystrophien Duchenne und Becker [67-68]. SNTB2 defiziente Mäuse zeigen allerdings keinen Phänotyp und bilden normale neuromuskuläre Verbindungen aus [62].



Andererseits ist SNTB2 mit wichtigen physiologischen Prozessen assoziiert. Die zweite PH Domäne zusammen mit der SU Domäne binden an Utrophin, welches wiederum an Aktin bindet [63, 69-70] (Abbildung 4 B).

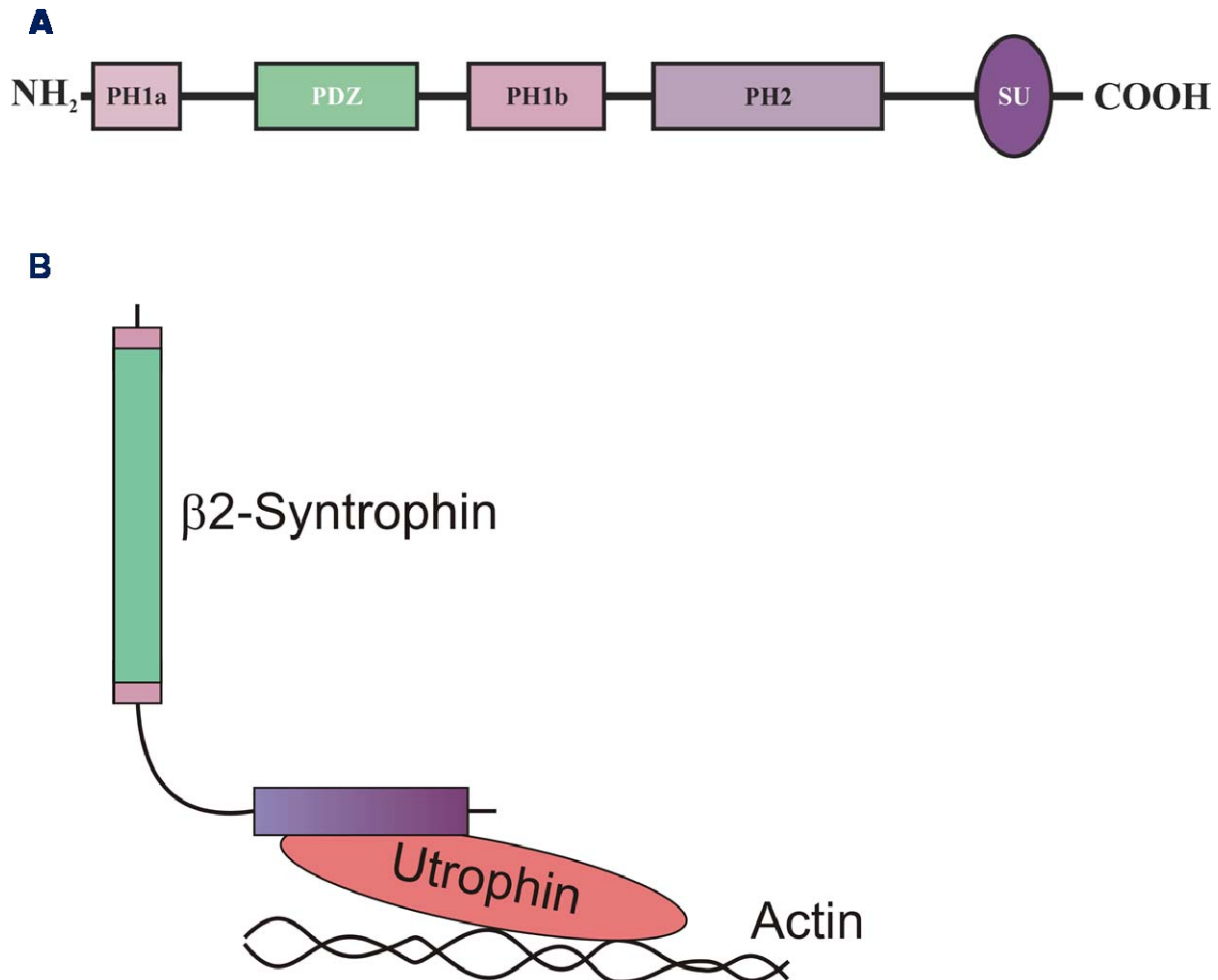


Abbildung 4: Aufbau (A nach [62]) der Syntrophine und Darstellung der Interaktion von  $\beta$ 2-Syntrophin mit Utrophin, welches mit dem Actin-Zytoskelett verbunden ist (B nach [63, 71]).

Dieser Komplex kann über die PDZ Domäne von SNTB2 an Rezeptoren, wie Islet Cell Autoantigen (ICA512) und ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) binden. Im Falle von ICA512 wird die Insulinfreisetzung der pankreatischen  $\beta$ -Zelle reguliert und im Falle von ABCA1, welches eine zentrale Rolle im High Density Lipoprotein (HDL) Stoffwechsel spielt, dessen Stabilität [63, 69, 72-73].

In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals die Expression von SNTB2 in Adipozyten nachgewiesen werden [74]. In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass SNTB2 in der Adipozytenzelllinie 3T3-L1 stark während der Adipogenese induziert wird und auch in verschiedenen Fettgeweben exprimiert wird. Der Knockdown von SNTB2 resultiert in morphologischen Veränderungen der Adipozyten. Diese Zellen bilden wenige, wesentlich

größere Lipidtropfen aus. Zellen mit größeren Lipidtropfen speichern deutlich weniger Triglyzeride als die Kontrollzellen mit mehreren kleinen Lipidtropfen. Unterschiede in der Insulinsensitivität zwischen SNTB2 siRNA und Kontroll transfizierten Zellen konnten nicht beobachtet werden. SNTB2 spielt somit eine Rolle für die Funktionalität der Adipozyten.

#### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, durch eine weitere funktionelle Charakterisierung von SNTB2 weiteren Einblick in die physiologische Rolle dieses Adapterproteins zu erhalten. Dabei stehen vor allem die Auswirkungen des Knockdowns von SNTB2 auf die Morphologie der Adipozyten, die Identifizierung von Interaktionspartnern und die metabolische Charakterisierung der SNTB2 defizienten Maus im Fokus der Untersuchungen.

In meiner Diplomarbeit konnte ich bereits SNTB2 in 3T3-L1 Präadipozyten nachweisen. In dieser Entwicklungsphase sind die Zellen noch teilungsfähig. RNA-Interferenz Experimente sollten Hinweise zur Funktion von SNTB2 in den Fibroblasten liefern.

In reifen Adipozyten hatte der, in Präadipozyten vollzogene Knockdown von SNTB2 die Ausbildung weniger großer Lipidtropfen zur Folge. In Drosophila konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Enzymen der Fettsäure- und der Cholesterinsynthese ebenfalls zu größeren Lipidtropfen führt [75]. Es sollte geklärt werden, ob dieser morphologischen Übereinstimmung auch gemeinsame molekulare Mechanismen zu Grunde liegen. Des Weiteren sollen die Fähigkeit zur Speicherung von Lipiden und die Lipolyseaktivität in den SNTB2 siRNA transfizierten Zellen bestimmt werden, um die verminderte Speicherung von Triglyzeriden zu klären. Zum Zwecke der Unterscheidung der direkten Effekte des Knockdown auf die Adipozyten und der Effekte auf die Adipogenese, werden RNA-Interferenz Experimente in Präadipozyten und in reifen Adipozyten durchgeführt.

Als Interaktionspartner von SNTB2 ist Utrophin bereits bekannt [76], und es soll geklärt werden inwiefern dieser Bindungspartner für die Funktion von SNTB2 in Adipozyten von Bedeutung ist. Darüber hinaus sollen weitere Interaktionspartner von SNTB2 identifiziert werden.

Die metabolische Charakterisierung der SNTB2 defizienten Maus soll die physiologische Bedeutung von SNTB2 beleuchten. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von SNTB2 einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel hat [77]. Metabolische Störungen treten deutlicher nach einer Hochfettdiät hervor. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit SNTB2  $-/-$  Mäuse nach 24 wöchiger Hochfettdiät untersucht.

---

Metabolische und morphologische Veränderungen des Fettgewebes und der Leber sollen bestimmt werden.

Des Weiteren soll das bekannte Adipositas-Modell der ob/ob Maus genutzt werden, um Veränderungen der SNTB2 Expression zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Agarosegelkammer (7 x 15 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Akku-Chek® Comfort	Roche
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Färbegestell Hecht	Omnilab
Färbekasten nach Hellendahl	Roth
Glaskasten mit Zubehör nach Hauser	Roth
Glaskasten Hecht	Omnilab
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Microtom RM 2145	Leica
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Mikroskop Axiovert 200 M und Zubehör	Zeiss
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocell	Millipore
Nucleofector I	Amara Biosystems
Peristaltikpumpe Pumpdrive 5001	Heidolph
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Photometer Scandrop 250 mit Zubehör	Analytik Jena
Photometer Varioscan Flash Multimode Reader	Thermo Scientific
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E835	Consort

---

Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Pumpe MC 1000 PEC	Multifix
Schüttler 3013	GFL
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
Sequenza Slide Rack	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Trans-Blot Cell Wet-Transferkammer	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Wasserbad HI 1210	Leica
Wasserbad WPE 45	Memmert
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon
Biosphere Filterspitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Combitips plus	Eppendorf
Dampfsterilisations-Indikatorband	Omnilab
Deckgläser	VWR
Elektrophorese Tips	Bio-Rad
ELISA 96 Lochplatte	Corning Costar®
Einmal-Feindosierungsspritze (1 ml)	Braun Injekt®-F
Filterspitzen	Biozym
Gentle Macs Tubes	Miltenyi
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	Bio-Rad
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
Mikrotube EDTA	Sarstedt

---

Objektträger Superfrost Ultra Plus	VWR
Parafilm	American National Can™
Petrischalen (10 x 1,5 cm)	BD Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Rundpapierfilter	Sarstedt
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Skalpell (No. 22)	Feather
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (25 ml, 50 ml)	Corning Costar®
Sterile Filterspitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterilfilter	Milipore
Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose (0,2 µm)	Bio-Rad
Trockenblock für Objektträger	Labomedic
Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 150 ml, 500 ml)	Millipore
Wattestab	Hartmann
Wägeschälchen	Omnilab
Whatman GB003 0,8 mm	VWR
Zell Schaber	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-Loch)	BD Falcon
Zellsieb Porengröße 100 µM	Omnilab

### 2.1.3 Chemikalien

1-kb DNA Molekulargewichtsleiter	Invitrogen
p-Propanol	Merck
Acrylamidlösung 40%	Bio-Rad
Adipozyten Differenzierungsmedium DM-2	ZenBio
Adipozyten Medium AM-1	ZenBio
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Gibco
Apo-Transferrin	Sigma
Ascorbat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Biotin	Sigma

---

Bisacrylamidlösung 2%	Bio-Rad
BODIPY	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma
BSA (fatty acid free)	Roche
BSA (Fraktion V)	Biomol
BSA (Fraktion V) für ELISA	Sigma
Chloroform	VWR
Collagenase NB4G	Serva
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Corticosteron	Sigma
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma
DAB	Dako
Desoxycholat	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMEM, Hochglukose Medium	Biochrom AG
DMEM/Ham' F-12	Cambrex
Entellan	Merck
Eosin G Lösung	Roth
Epinephrin	Sigma
ER-Tracker	Invitrogen
Essigsäure (99%)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako
Fast Green FCF	Sigma
Fetuin	MP
Fluorescence Mounting Medium	Dako
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Formaldehydlösung 37 %	Merck
Full Range Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham
Glukose	Fluka
Glutardialdehyd	Merck
Glyzerin	Merck
Glyzerin-Standard	Sigma
Glyzin	Merck
Hämalaunlösung	Roth
HEPES	Sigma
Histol	Roth
IBMX	Serva
Igepal	Sigma
Imidazol	Sigma
Insulin, bovines	Sigma

---

Insulin, humanes	Lilly
Kaliumchlorid	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Linolsäure	Sigma
Lovastatin	Calbiochem
LPS	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Vitalia
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Mevalonat	Sigma
N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Newborn calf serum (NCS)	Sigma
Nukleasefreies Wasser	Promega
Oil Red O	Sigma
Ölsäure	Sigma
Pantothensäure	Sigma
PBS Dulbecco	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Gibco
peqGOLD Protein Marker	Peqlab
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Picrinsäure	Merck
PM-1 (Präadipozytenmedium)	Zenbio
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SeaKam LE Agarose	Biozym
SeaKem <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> Agarose	Cambrex
Sirius Red	Merck
tert-Butanol	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Tris-NH <sub>3</sub>	Merck
Tris-HCl	Merck
TRIzol Reagenz	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma



---

Wasserstoffperoxid (30 %ig)	Merck
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck
Zitronensäure Monohydrat	Merck

#### 2.1.4 Kit-Systeme

Nachfolgend sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme aufgeführt.

BCA Protein Assay Kit	Pierce
Caspase Glo <sup>®</sup> 3/7 Assay System	Promega
Cell Line Nucleofector Kit L	Lonza
Cell Titer Blue Assay	Promega
Cholesterol/Cholesteryl Ester Kit	BioCat
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
Direct cAMP ELISA Kit	EnzoLife Science
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System Glukagon	R&D Systems
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System mouse Adiponektin	R&D Systems
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System mouse Chemerin	R&D Systems
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System mouse IL-6	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
Endo-Porter	GeneTolls
Envision <sup>™</sup> + Kit HRP mouse DAB+	Dako
Free Fatty Acid Kit	BioCat
Free Glycerol Assay Kit	BioCat
Insulin mouse ELISA	Mercodia
IP/Co-IP Kit Pierce Protein A/G Magnetic	Thermo Scientific
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Mini Elute Kit	Qiagen
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Mini Elute Kit	Qiagen
Quantichrom <sup>™</sup> Glucose Assay Kit	Biotrend
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
Triglyzeride GPO-PAP, Halbmikro-Test	Roche
X-tremeGene siRNA Transfection Reagent	Roche

### 2.1.5 Antikörper

Im Folgenden sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK) sowie die Spezies, aus der die AK isoliert wurden, aufgeführt.

#### 2.1.5.1 Primäre Antikörper

Anti-ABCA1 (AB.H10) mAK	Maus	Abcam
Anti- $\alpha$ Tubulin (DM1A) mAK	Maus	Cell Signaling Technologies
Anti-Adipophilin pAK	Huhn	Abcam
Anti-AKT (pan) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-ATGL (30A4) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti- $\beta$ Actin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Caveolin-1 (D46G3) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-C/EBP $\alpha$ pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Chemerin pAK	Ziege	R&D Systems
Anti-Cyclophilin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-EEA1 (C45B10) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FABP4 pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FAS (C20G5) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FSP27 pAK	Kaninchen	Novus
Anti-GAPDH (14C10) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-GLUT4 (1F8) mAK	Maus	Cell Signaling Technologies
Anti-HSL pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-LAMP1 (C54H11) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-panSNT mAK	Maus	Marvin Adams (Kooperation)
Anti-Perilipin (D418) pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-AKT (Ser473) (D9E) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-C/EBP $\alpha$ pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-HSL pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SCD-1 (C12H5) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SNTB2 pAK	Kaninchen	Marvin Adams (Kooperation)
Anti-SOD2 pAK	Kaninchen	Acris Antibodies
Anti-SREBP1c mAK	Maus	Labvision
Anti-SREBP2 pAK	Kaninchen	Cayman Chemical
Anti-TIP47 pAK	Ziege	Abcam
Anti-TRL4 pAK	Kaninchen	Werner Falk (Innere MedizinI)
Anti-UCP-1 pAK	Kaninchen	Abcam
Anti-Utrophin mAK	Maus	BD Biosciences

### 2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Maus HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege HRP-konjugierter AK	Kaninchen	Jackson Immuno Research
Anti-Huhn HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Alexa Flour <sup>®</sup> 488 konjugierter AK	Ziege	Invitrogen
Anti-Rabbit Alexa Flour <sup>®</sup> 488 konjugierter AK	Ziege	Invitrogen
Anti-Maus Alexa Flour <sup>®</sup> 546 konjugierter AK	Ziege	Invitrogen
Anti-Rabbit Alexa Flour <sup>®</sup> 546 konjugierter AK	Ziege	Invitrogen

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

Um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Zudem wurde im Primerdesign berücksichtigt, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug (Roche Applied Science, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: [www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp](http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp)).

Die Identität des amplifizierten DNA-Produkts wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit Hilfe des jeweiligen uni-Primers durch die Firma GeneArt (Regensburg) überprüft.

#### 2.1.6.1 Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	PCR Produkt (bp)
18S rRNA_m_uni	GAT TGA TAG CTC TTT CTC GAT TCC	217
18S rRNA_m_rev	CAT CTA AGG GCA TCA CAG ACC	
αSMA_m_uni	CCA GCA CCA TGA AGA TCA AG	129
αSMA_m_rev	CTT CGT CGT ATT CCT GTT TGC	
Caveolin-1_m_uni	AGC TGA TGA GTG AAC CTC CAG	343
Caveolin-1_m_rev	TGT GAG CTG GGA AGT AAA AGG	
Chemerin_m_uni	AAA CAC CCA CCT GTG CAG T	213
Chemerin_m_rev	TTT TAC CCT TGG GGT CCA TT	

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	PCT Produkt (bp)
Col1A1_m_uni	GAC TGG CAA CCT CAA GAA GG	126
Col1A1_m_rev	CAA GTT CCG GTG TGA CTC G	
Cyclophilin_m_uni	AAC ACA AAC GGT TCC CAG TT	326
Cyclophilin_m_rev	TTG AAG GGG AAT GAG GAA AA	
F4/80_m_uni	TGC TCT TCC TGA TGG TGA GA	182
F4/80_m_rev	CCC CGT CTC TGT ATT CAA CC	
FAS_m_uni	TGG GTG CTG ACT ACA ACC TCT	333
FAS_m_rev	CGC GTG ATG GTC TGT TTG T	
G6PDH_m_uni	CGT GCT CCA GCA TAA GCT CT	356
G6PDH_m_rev	GCT CAC CGT GTC CAA TGT AG	
GAPDH_m_uni	TGT CCG TCG TGG ATC TGA C	375
GAPDH_m_rev	AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG	
HMG_CoA_m_uni	TGT GCT TGG GGC TTC TGT A	225
HMG_CoA_m_rev	CCA CGT TCA TGA GTT TCC ATT	
IL-6_m_uni	TTC CAT CCA GTT GCC TTC TT	231
IL-6_m_rev	TTC TGC AAG TGC ATC ATC GT	
PEPCK_m_uni	CTT TGG TGG CCG TAG ACC T	239
PEPCK_m_rev	CGA ACA TCC ACT CCA GCA C	
SCD-1_m_uni	CCG GGA GAA TAT CCT GGT TT	328
SCD-1_m_rev	CAC CCC GAT AGC AAT ATC CA	
SNTB2_m_uni	CAT ATT GTA CCG CTA TCC CTT TG	353
SNTB2_m_rev	TGT GGT CCA GCA GTG GTC T	
SREBP1c_m_uni	ACA CCA GCT CCT GGA TCG	313
SREBP1c_m_rev	AAA GGT CCT CAA GGG AAA GC	
SREBP2_m_uni	CCC TAT TCC ATT GAC TCT GAG C	71
SREBP2_m_rev	GTC AAG GAT GAA CCG GAC TC	

### 2.1.7 siRNAs

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Silencer® Select Pre-designed siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen. Als Kontrolle für die genspezifischen siRNAs diente die Silencer® Select Negative Control#1 siRNA der Firma Ambion.

Identifikationsnummer	siRNA	Sequenz (5' → 3')
s63424	Caveolin_sense	CCAUCUACGUCCAUAACCUtt
	Caveolin_antisense	AAGGUAUGGACGUAGAUGGag
s63425	Caveolin_sense	CGACGACGUGGUCAAGAUtt
	Caveolin_antisense	AAUCUUGACCACGUCGUCGtt

Identifikationsnummer	siRNA	Sequenz (5' → 3')
s65865	FAS_sense	GCAGUUCUGCUGACUAAGatt
	FAS_antisense	UCUUAGUCAGCAGAACUGcta
s65867	FAS_sense	GAAGGAUGUUCAGACCAAAtt
	FAS_antisense	UUUGGUCUGAACAUCCUUCag
s74119	SNTB2_sense	ACCUUGAUCUUACGCUGCatt
	SNTB2_antisense	UGCAGCGUAAGAUCAAGGugt
s74120	SNTB2_sense	GAAGAUGUCUGCUGAUGAtt
	SNTB2_antisense	AUCAUCAGCAGACAUCUUCag
s74121	SNTB2_sense	GCAAGGAAGUCAAGCAUAUtt
	SNTB2_antisense	AUAUGCUUGACUCCUUGctg
143000	SNTB2_sense	GGUGAGGCUUACUAUUCActt
	SNTB2_antisense	GUGAAUAGUAAGCCUCACctc
s74387	SREBP2_sense	CAGCCUUUGAUUAUACCAGatt
	SREBP2_antisense	UCUGGUUAUAUCAAAGGCUGct
s74388	SREBP2_sense	GCAGUACAGCGGUCAUUCatt
	SREBP2_antisense	UGAAUGACCGCUGUACUGCag
s74389	SREBP2_sense	CUGGUACGCUGGUUACUCatt
	SREBP2_antisense	UGAGUAACCAGCGUACCAGgc
s75835	Utrophin_sense	CGAACUGAAUCAAACCGCatt
	Utrophin_antisense	UCCGGUUUGAUUCAGUUCGtc
s75836	Utrophin_sense	GGACCUAUUGGAGACCGUutt
	Utrophin_antisense	AACGGUCUCCAAUAGGUCctt
s75837	Utrophin_sense	GGUUGAGAAUGUUCGGGAAtt
	Utrophin_antisense	UUCCCGAACAUUCUCAACctg

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung sämtlicher selbst hergestellter Puffer und Lösungen aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden diese bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

#### 2.1.8.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

##### Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach:

Tris-NH <sub>3</sub>	121	g
Essigsäure (99%)	28,6	ml
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	50	ml
	ad 0,5	l ddH <sub>2</sub> O

**Gelladepuffer, 10-fach:**

Glyzerin (87%)	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

**2.1.8.2 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen****2.1.8.2.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten****RIPA-Lysepuffer:**

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholat	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer jeweils eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

**RIPA-Lysepuffer für den GentleMACS**

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Desoxycholat	0,25	g
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer jeweils eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Aufschluss der Proben mit dem GentleMACS wurden pro 1 ml RIPA-Puffer 100 µl Igepal (10 %ig) und 5 µl SDS (20 %ige Stammlösung) zugegeben.

### 2.1.8.2.2 Lösungen für SDS-PAGE

#### SDS-Probenpuffer (5 x Lämmli), 5-fach:

Glyzerin 20%	5	ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	300	μl
SDS 20%	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH <sub>2</sub> O

Der Puffer wurde stets im Verhältnis 1:5 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

#### SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH <sub>2</sub> O	32,0	ml

#### Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH <sub>2</sub> O	28,5	ml

#### Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH <sub>2</sub> O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenngels bzw. des Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugegeben.

### 2.1.8.2.3 Lösungen für Western-Blotting

**Tank-Puffer, 10-fach:**

Glyzin	140	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**Wettransfer-Puffer:**

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**PBST:**

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

**TBS, pH 7,6, 10-fach**

Tris-NH <sub>3</sub>	24,2	g
NaCl	80	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

**TBS:**

TBA, pH 7,6, 10-fach	100	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**TBST:**

TBA, pH 7,6, 10-fach	100	ml
Tween® 20	1	ml
	ad 1	l TBS

**Blockierlösung PBST:**

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

**Blockierlösung TBST:**

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml TBST

Die Blockierlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.



#### 2.1.8.2.4 Antikörperlösungen

**BSA-PBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

**BSA-TBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l TBS

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Primäre Antikörper wurden in diesen Lösungen in der Regel im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

Sekundäre Antikörper wurden in den Blockierlösungen 1:5000 verdünnt.

#### 2.1.8.2.5 Lösungen für ELISAs

**Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

**Reagent Diluent:**

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

**Substratlösung:**

Die beiden Lösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

**Stopplösung:**

Schwefelsäure rauchend	5,7	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**Verdünnung des Standards, der Antikörper und des HRP-Streptavidin-Konjugats:**

Dem Protokoll des Herstellers folgend, wurde der Standard in Reagent Diluent, der Capture AK in PBS, der Detection AK und das HRP-Streptavidin-Konjugat in Reagent Diluent verdünnt.

**Verdünnung der Proben:**

Die Proben wurden gemäß Herstellerprotokoll in Reagent Diluent verdünnt.

**2.1.8.2.6 Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen****Fixierlösung:**

Methanol	400	ml
Essigsäure (99 %)	100	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**Inkubationslösung:**

Ethanol	300	ml
NaAc x 3H <sub>2</sub> O	68	g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	2	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurden pro 50 ml der Inkubationslösung 130 µl Glutardialdehyd (50 %) frisch zugesetzt.

**Silberlösung:**

AgNO <sub>3</sub>	0,1	g
	ad 0,1	l ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurden 50 ml Silberlösung mit 10 µl Formaldehyd (37 %) versetzt.

**Entwicklerlösung:**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	g
	ad 0,1	l ddH <sub>2</sub> O

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 50 ml Entwicklerlösung mit 5 µl Formaldehyd (37 %) versetzt.

**Stopplösung:**

EDTA	14,6	g
	ad 0,1	l ddH <sub>2</sub> O

**Preservierlösung:**

Glyzerin	5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**2.1.8.3 Lösungen für Oil Red O Färbung****Stammlösung:**

Oil Red O	0,175	g
	ad 0,05	l 2-Propanol

Die Lösung wurde über Nacht bei 37°C unter Rühren gelöst, anschließend filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

**Arbeitslösung:**

Stammlösung	0,6	l
ddH <sub>2</sub> O	0,4	l

Die Herstellung und anschließende Filtration der Lösung fand erst unmittelbar vor Gebrauch statt.

**Fixierungs-Lösungen:**

10%ige Formaldehydlösung in PBS

60%iger 2-Propanol in PBS

**2.1.8.4 Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung****Blockier- und Antikörperlösung:**

BSA	0,6	g
Tween® 20	0,01	ml
	ad 0,02	l PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.8.5 Lösungen für Immunhistochemiefärbung

#### Alkohollösungen für Alkoholreihe

96 %iger Ethanol: 480 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

90 %iger Ethanol: 450 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

80 %iger Ethanol: 400 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

70 %iger Ethanol: 350 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

#### Waschpuffer

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l TBS

#### Citratpuffer

#### Stammlösung A

C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	21,01	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Stammlösung B

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	29,41	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Gebrauchslösung

Stammlösung A	18	ml
Stammlösung B	82	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Die Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Gebrauchslösung wurde direkt vor dem Gebrauch hergestellt.

### 2.1.8.6 Puffer zur Adipozytenisolierung

#### Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer pH 7,4

D-Glukose	1,8	g
MgCl <sub>2</sub>	46,8	mg
KCl	0,34	g
NaCl	7,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,18	g
NaHCO <sub>3</sub>	1,26	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Vor Zugabe des Natriumbicarbonats wurden zuerst die anderen Bestandteile in ddH<sub>2</sub>O gelöst.  
Der Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

#### Kollagenasepuffer

BSA (Faktion V)	0,4	g
Collagenase NB4G	16,7	mg
	ad 10	ml Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer

#### Stopplösung

BSA (Faktion V)	0,4	g
	ad 10	ml Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer

#### Erythrozyten-Lysepuffer

NH <sub>4</sub> Cl	8,29	g
KHCO <sub>3</sub>	1	g
EDTA	37,2	mg
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 – 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.8.7 Lösungen für Fettsäurestimulationen

#### Ölsäure 200 mM

Oleic Acid	0,056	g
	ad 1	ml Ethanol

**Palmitinsäure 200 mM**

Palmitic acid	0,051 g
	ad 1 ml Ethanol

**Linolsäure 200 mM**

Linolic acid	0,056 g
	ad 1 ml Ethanol

Die 200 mM Lösungen wurden auf 70°C erwärmt, bis sie in Lösung gegangen waren.

**BSA Lösung**

BSA (fatty acid free)	1 g
	ad 10 ml ddH <sub>2</sub> O

Die BSA Lösung wurde sterilfiltriert und auf 55°C erwärmt.

**Fettsäure Stocklösungen 20 mM**

200 mM Fettsäurelösung (70°C)	100 µl
BSA Lösung (55°C)	900 µl

**Kontroll Stocklösungen**

Ethanol	100 µl
BSA Lösung	900 µl

Die Stocklösungen wurden bei -20°C aufbewahrt und vor jedem Gebrauch auf 55°C erwärmt.

**2.1.9 Medien für murine Fibroblastenzellen****2.1.9.1 Kultivierungsmedium**

DMEM HochGlukose (4,5g/l), 10 % Serum von neugeborenen Kälbern (NCS Newborn Calf Serum) und 1 % Penicillin/ Streptomycin.

### 2.1.9.2 Differenzierungsmedium

DMEM/Ham's F-12 enthält bereits 15 mM HEPES und L-Glutamin 365,10 mg/l.

Zusätze:

- 5 % Serum von neugeborenen Kälbern (NCS *Newborn Calf Serum*)
- 1 % Penicillin/ Streptomycin
- 2 µg/ml apo Transferrin
- 17 µM Pantothensäure
- 1 µM Biotin
- 300 µg/ml Fetuin
- 1 µM Corticosteron (frisch zusetzen)
- 200 µM Ascorbat (frisch zusetzen)
- 20 µM IBMX (frisch zusetzen)
- 100 nM Insulin (frisch zusetzen)

### 2.1.10 Medien für primäre Adipozyten

#### 2.1.10.1 Kultivierungsmedium

##### Präadipozyten-Medium: (PM-1)

DMEM/Ham's F12 (1:1. v/v)

Enthaltene Zusätze:	HEPES, pH 7,4
	FCS
	Penicillin
	Streptomycin
	Amphotericin B
	D-Glukose

##### Adipozyten-Medium: (AM-1)

DMEM/Ham's F12 (1:1. v/v)

Enthaltene Zusätze:	HEPES, pH 7,4
	FCS
	Biotin
	Pantothensäure
	Humanes Insulin
	Dexamethason
	Penicillin
	Streptomycin
	Amphotericin B
	D-Glukose

### 2.1.10.2 Differenzierungsmedium

#### Adipozyten-Differenzierungsmedium: (DM-2)

DMEM/Ham's F12 (1:1. v/v)

Enthaltene Zusätze:

HEPES, pH 7,4  
FCS  
Biotin  
Pantothensäure  
Humanes Insulin  
Dexamethason  
Isobutylmethylxanthin  
PPAR $\gamma$  Agonist  
Penicillin  
Streptomycin  
Amphotericin B  
D-Glukose

### 2.1.11 Organismen

Die Kultivierung der verwendeten Zellen und Zelllinien fand stets in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen von 37°C Temperatur, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit statt.

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
3T3-L1	murine Fibroblasten (ATCC)
<b>Zellen</b>	<b>Herkunft</b>
Primäre humane Präadipozyten	subkutanes Fettgewebe (BioCat)



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von Zellen**

#### **2.2.1.1 Kultivierung der Fibroblastenzelllinie 3T3-L1**

Die Zelllinie 3T3-L1 ist ein Klon der aus Swiss Mausembryonen gewonnenen Fibroblastenzelllinie 3T3, die in der Lage ist, im konfluenten Zustand zu Adipozyten zu differenzieren. Sie stellt eine der am besten charakterisierten, präadipozytären Zelllinien dar. Die Differenzierung erfolgt durch die Zugabe einer Mischung aus adipogenen Substanzen, sodass sowohl funktionell als auch morphologisch eine sehr hohe Ähnlichkeit zu primären Adipozyten erreicht wird [78-79].

3T3-L1 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für adhärente Zellen in 12 ml DMEM Medium supplementiert mit 10% NCS (siehe 2.1.9.1, Kultivierungsmedium) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden einmal wöchentlich nach Erreichen von 80-90% Konfluenz passagiert. Durch die Verwendung von Trypsin spalteten sich Zell-Zell Kontakte während einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C auf und ermöglichte somit das Lösen der Zellen vom Flaschenboden. Die Reaktion wurde anschließend mit frischem Anzuchtmedium, supplementiert mit Serum zur Inaktivierung von Trypsin, abgestoppt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### **2.2.1.2 Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten**

3T3-L1 Fibroblasten der Passage 3 bis 8 wurden in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in Zellkulturschalen in frischem Anzuchtmedium ausgesät. Die Induktion der Differenzierung erfolgte am nächsten Tag (Tag 0 der Differenzierung). Dazu wurde das Kultivierungsmedium entfernt und durch Differenzierungsmedium (siehe 2.1.9.2) ersetzt. An den Tagen 3 und 6 wurde dieses Differenzierungsmedium erneuert. Am Tag 7 wurde ein weiterer Mediumwechsel mit serumfreiem DMEM/Ham's F-12, versetzt mit 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 µM Insulin, durchgeführt. Am Tag 8 wurden die Zellen auf serumfreies DMEM/Ham's F-12 Medium, versetzt mit 1 % Penicillin/ Streptomycin, gesetzt. Am Tag 9 war die Differenzierung vollständig abgeschlossen. Der Grad der Zelldifferenzierung wurde durch Lipidfärbung mit Oil Red O bzw. durch Mikroskopie kontrolliert.

### **2.2.1.3 Differenzierung von primären humanen Adipozyten**

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Adipozyten wurden von der Firma BioCat als Präadipozyten, isoliert aus verschiedenen Spendern, bezogen. Die Zellen wurden anschließend in vitro nach Angaben des Herstellers zu reifen Adipozyten differenziert. Dazu wurden die Präadipozyten in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für adhärente Zellen für mehrere Tage bis zu einer Konfluenz von 85-90 % in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre in PM-1 Medium (Präadipozyten-Medium) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend passagiert bzw. in PM-1 ausgesät. In Zellkulturschalen wurden die Zellen für 24-48 h bis zu einer Konfluenz von 85-90 % auf PM-1 gehalten. Daraufhin wurde die Differenzierung induziert, indem das Medium durch DM-2 (Adipozyten-Differenzierungsmedium) ersetzt wurde. Nach 7 Tage Differenzierung wurde am Tag 8 das Medium durch eine Mischung aus einem Teil DM-2 und zwei Teilen AM-1 (Adipozyten-Medium) ersetzt. Nach weiteren 7 Tagen in Kultur waren die Zellen zu Lipidtröpfchen tragenden Adipozyten herangereift und konnten für Stimulationen verwendet werden. Die Stimulation erfolgte in DMEM/Ham's F-12 supplementiert mit Penicillin und Steptomycin.

### **2.2.1.4 RNA-Interferenz**

Durch die Verwendung von siRNA kann ein spezifischer Knockdown eines Gens in Zellen verursacht werden [80]. Die siRNA besteht dabei aus doppelsträngiger RNA (dsRNA), die durch Transfektion in die Zellen eingebracht wird. Die Sequenz der siRNA wird so gewählt, dass sie zu einem kleinen Abschnitt der mRNA des Zielgens homolog ist. In der Zelle läuft daraufhin ein Prozess ab, der durch das Protein Dicer vermittelt wird: die doppelsträngige RNA wird in 19–22 bp lange Oligonukleotide gespalten, der sense-Strang wird degradiert, während der antisense-Strang in den RNA induced silencing complex (RISC) eingebaut wird. Mit Hilfe dieser RNA-Fragmente kann der Komplex an komplementäre mRNA Abschnitte des Zielgens binden. Dieser Prozess führt schließlich zur gerichteten Spaltung und Degradation komplementärer mRNA. So wird es möglich, die Expression eines ausgewählten Gens zu unterdrücken (Knockdown), ohne die Expression anderer Gene zu verändern.

#### **2.2.1.4.1 Transfektion der Präadipozyten**

Die Transfektion von 3T3-L1 Präadipozyten oder humanen Präadipozyten mit siRNA wurde mit dem XtremeGENE siRNA Transfection Reagent von Roche oder dem Endo-Porter der

Firma GeneTools durchgeführt. Ein Transfektionsansatz mit Xtreme setzte sich folgendermaßen zusammen:

siRNA (100 nM)	10 µl
Xtreme	5 µl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	85 µl

Das Medium wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt. Die siRNA und das Transfektionsreagenz wurden nacheinander zugegeben, der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen (900 µl frischem Zellkulturmedium) gegeben.

Ähnlich dem Transfektionsansatz mit Xtreme setzte sich ein Ansatz mit dem Endo-Porter wie folgt zusammen:

siRNA (100 nM)	10 µl
Endo-Porter	7 µl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	83 µl

Hier wurde der Ansatz für 1 h auf Raumtemperatur inkubiert.

Die Präadipozyten wurden stets am Tag 0 der Differenzierung transfiziert. Die weitere Differenzierung und Stimulation erfolgte wie zuvor beschrieben.

#### **2.2.1.4.2 Transfektion reifer Adipozyten**

Die Elektroporation stellt eine physikalische Methode dar, um Zellen mittels Strom zu permeabilisieren, damit beispielsweise RNA in die Zelle geschleust werden kann. Dieses Verfahren wurde hier für reife Adipozyten angewendet um siRNAs in die Zellen einzubringen. Für die Elektroporation wurde der Nucleofector I von Amaxa Biosystems mit dem Nucleofector Kit L von Lonza verwendet. 3T3-L1 Zellen wurden zu reifen Adipozyten ausdifferenziert (siehe 2.2.1.2) und nach den Angaben des Herstellers elektroporiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf Differenzierungsmedium gesetzt und 3 weitere Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und analysiert.

### **2.2.1.5 Stimationsversuche**

Für die Stimationsversuche mit Fettsäuren und Epinephrin wurden 3T3-L1 Zellen als Präadipozyten transfiziert und anschließend differenziert, oder als reife Adipozyten elektroporiert und stimuliert.

#### **2.2.1.5.1 Inkubation mit Fettsäuren**

Mit den angegebenen Fettsäuren, welche zuvor mit BSA komplexiert wurden (siehe 2.1.8.7) wurden die 3T3-L1 Zellen für 24 h in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellkulturüberstände und die Zelllysate gewonnen und die intrazelluläre Speicherung der Fettsäuren in Form von Triglyzeriden untersucht.

#### **2.2.1.5.2 Stimulation mit Epinephrin**

Epinephrin wurde in 10 mM HCl gelöst und auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt (100 nM und 500 nM). Für 2 h wurden 3T3-L1 Adipozyten mit Epinephrin bzw. mit der HCl-Lösungsmittelkontrolle kultiviert und die Zellkulturüberstände und die Zelllysate gewonnen. Die Lipolyse wurde in den Überständen durch Bestimmung des freien Glyzerins untersucht, während Westernblotanalysen der Lysate Aufschluss über lipogene Enzyme liefern sollten.

#### **2.2.1.5.3 Cholesterindepletion**

Für die Cholesterindepletion wurden 3T3-L1 Zellen am Tag 6 nach der Induktion der Differenzierung mit 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin bis zum Ende der Adipogenese behandelt. Auch eine Kostimulation mit 100  $\mu\text{M}$  Mevalont wurde durchgeführt um die Lovastatineffekte zu kompensieren. Die Zellen wurden nach den Stimulationen optisch untersucht und sowohl für mRNA- als auch für Proteinanalysen verwendet.

Des Weiteren wurden reife primäre humane Adipozyten für 24 h mit 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin stimuliert und mikroskopisch untersucht.

### **2.2.1.6 Bestimmung des Zelltodes**

#### **2.2.1.6.1 Zytotoxizität**

Als System zur Untersuchung einer möglichen zytotoxischen Wirkung des Knockdown von SNTB2 auf die Zellen wurde der Cytotoxicity Detection Kit von Roche verwendet. Der Kit ermöglicht einen enzymgekoppelten kolorimetrischen Nachweis der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberständen. Die Lactat-Dehydrogenase ist ein sehr stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in Folge des Zelltodes in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Die gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand korreliert somit direkt mit der Anzahl der abgestorbenen Zellen. Der frische Zellkulturüberstand wurde 1:2 mit dem jeweils verwendeten Kulturmedium verdünnt und auf einer 96-Loch-Platte mit den Reaktionskomponenten NAD<sup>+</sup>, Katalyst und dem Farbstoff Tetrazolium laut Protokoll des Herstellers versetzt. Als Negativkontrolle diente das Kulturmedium. Während einer 30 minütigen Inkubation bei RT unter Lichtabschluss setzt die LDH das im Überstand enthaltene Lactat zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup> reduziert wird. Der Katalyst schließlich setzt in einer zweiten Reaktion den schwach gelben Farbstoff Tetrazolium unter Verbrauch des in der ersten Reaktion gebildeten NADH/H<sup>+</sup> in den roten Farbstoff Formazan um, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden kann.

#### **2.2.1.6.2 Apoptose**

Der Caspase-Glo Assay misst Caspaseaktivitäten unter Verwendung eines proluuminogenen Caspase-3/7 Substrats und einer Luciferase. Die Zugabe des Puffers führt zur Zelllyse, gefolgt von der Spaltung des Substrats durch die Caspase. Diese Spaltung setzt Aminoluciferin frei, das durch die Caspase unter Erzeugung eines lumineszenten Signals verbraucht wird. Das Signal ist proportional zu der vorhandenen Caspaseaktivität ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

### **2.2.1.7 Bestimmung der Viabilität**

#### **2.2.1.7.1 Auszählung der vitalen Zellen**

Die Zählung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop in der Neubauerzählkammer, die in 4 mal 16 Quadrate unterteilt ist. 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension wurde auf die Zählkammer aufgebracht. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der nicht von vitalen Zellen

aufgenommen werden kann. Nach Bildung des Mittelwerts der ungefärbten Zellen aus den 16 Quadraten multipliziert mit dem Faktor 10000 konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden.

#### **2.2.1.7.2 CTB Zellviabilitätsassay**

Der Cell Titer Blue Assay bestimmt die Anzahl der lebenden Zellen in einer Kultur. Hierbei wird das Reduktionspotential der Zellen erfasst. Die Reduktion des im Assay enthaltenen fluorogenen Farbstoffes Resazurin zu Resorufin ist proportional zu der Zahl der metabolisch aktiven Zellen ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

### **2.2.2 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen wird aus der Extinktion bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Dabei wird in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen Wasser als Referenz gemessen. Die Lösung wurde im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (V) und des für doppelsträngige DNA spezifischen Extinktionsfaktors von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $\epsilon_{\text{dsDNA}}$ ) konnte die DNA-Konzentration ( $c_{\text{dsDNA}}$ ) mit folgender Formel berechnet werden:

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{dsDNA}} \cdot V$$

$c_{\text{dsDNA}}$ : Konzentration an dsDNA in der Lösung [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

$E_{260}$ : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

$\epsilon_{\text{dsDNA}}$ : Extinktionskoeffizient von dsDNA, gleich  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

V: Verdünnungsfaktor, hier 100

Die Reinheit der DNA konnte durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Bei reiner, nicht degradiert DNA liegt das Verhältnis von  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  zwischen 1,8 und 2,1.

#### **2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Durch die Auftrennung der DNA in 1,5 %igen Agarosegelen wurde die Größe von DNA-Molekülen analysiert. Die Agarose wurde dazu in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst, in einer Mikrowelle aufgeköcht und versetzt mit 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Die Proben wurden in Gelladepuffer aufgenommen, in die

Taschen gefüllt und bei einer Spannung von 80 V im Gel (bedeckt mit 1x TAE-Puffer) aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. Nach Auftrennung konnten die DNA-Fragmente dann im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und gegebenenfalls für eine Aufreinigung ausgeschnitten werden.

### 2.2.2.3 Real-Time PCR

Die Real-Time RT-PCR ist eine Methode, die auf der herkömmlichen DNA-Amplifikation mit Hilfe von PCR beruht, jedoch zusätzlich eine schnelle und reproduzierbare Quantifizierung von Nukleinsäuren zulässt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet, dessen Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert und so ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex entsteht, der grünes Licht ( $\lambda = 521 \text{ nm}$ ) emittiert. Die Fluoreszenz verhält sich somit direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge.

Ein typischer Reaktionsansatz hat folgendes Schema.

Reaktionsmix (Roche)	2	$\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4	$\mu\text{l}$
universe Primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1	$\mu\text{l}$
reverse Primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1	$\mu\text{l}$
cDNA	2	$\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	11,6	$\mu\text{l}$

SYBR<sup>®</sup> Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix bereits enthalten. Die Reaktion wurde in dünnen Glaskapillaren durchgeführt, die über ein Probenkarussell in die Reaktionskammer eingebracht wurden. Zur Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase beginnt das Protokoll mit einem initialen Hitzeschritt für 10 min bei 95°C. Anschließend wurden 40-45 Amplifizierungszyklen durchgeführt. Dabei setzte sich jeder Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 62°C und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammen. Die genaue Annealingtemperatur wurde anhand der Schmelztemperatur des für die jeweilige Reaktion eingesetzten Primerpaares bestimmt. Nach der Amplifikation wurde bei jedem Lauf noch die Spezifität des PCR-Produktes anhand einer Schmelzkurve analysiert. Dazu wird die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Ist die PCR-Reaktion spezifisch, d.h. wird nur ein PCR-Produkt generiert, so nimmt die Fluoreszenz an einer für das Produkt

charakteristischen Temperatur abrupt ab. In dieser Arbeit wurde die Spezifität der LightCycler-PCR-Produkte bei jedem Lauf über die Schmelzkurve validiert.

Zur Berechnung der Ausgangskonzentration an cDNA wurde in jedem Amplifikationszyklus nach Abschluss der Elongationsphase, bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C), die Fluoreszenz der Probe gemessen. Die Fluoreszenzmesswerte werden nun in einem Graphen gegen die Zyklenzahl aufgetragen, was eine Bestimmung des sog. Crossing Point (Cp) während der exponentiellen Phase der PCR ermöglicht. Dieser Punkt bezeichnet den Reaktionszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts messbar zunimmt im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz. Durch die Verwendung einer Standardkurve kann die Effizienz unterschiedlicher PCR-Reaktionen berücksichtigt werden. Anhand dieser Standardkurve können die gemessenen Cp-Werte der Proben in arbiträre Werte umgerechnet werden. Diese Umrechnung der Cp-Werte mit Hilfe der Standardkurve in definierte Zahlenwerte erlaubt es, PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Effizienzen zu vergleichen.

Um nun eine Aussage über eine veränderte Genexpression treffen zu können, wurde neben der mRNA der Zielgene auch die mRNA eines bzw. mehrerer Housekeeping Gene bestimmt. Ein Housekeeping Gen ist ein Gen, das in den verschiedenen Geweben bzw. durch die verwendete Stimulation der Zellen nicht reguliert wird. Der Quotient aus Konzentration  $cDNA_{\text{Zielgen}}$  zu Konzentration  $cDNA_{\text{Housekeeping Gen}}$  gibt somit einen zum Referenzgen normalisierten Wert wieder. Der Quotient der normalisierten Werte zweier Proben wiederum drückt die relative Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der verwendeten Stimulation bzw. in den verschiedenen Geweben aus.

#### **2.2.2.4    Aufreinigung und Sequenzierung von DNA**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GeneArt (Regensburg) unter Verwendung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [81] durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Fragmente in einem Agarosegel (1,5 %) aufgetrennt und aus dem Gel-Stück extrahiert. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgte nach dem Protokoll des QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kits (Qiagen). Im Scandrop Photometer wurde die DNA-Konzentration gemessen. Für die Sequenzierung wurde die DNA mit sequenzspezifischen Primern an die Firma GeneArt versandt.



### 2.2.3 Arbeiten mit RNA

#### 2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben erfolgte mit dem TRIzol Reagenz von Invitrogen. Die Zellen wurden dazu nach einem Waschschrift mit PBS in 500 µl TRIzol aufgenommen und zum Scheren der genomischen DNA durch eine dünne Kanüle auf- und abgezogen. Die Gewebe wurden im GentleMacs mit 1 ml TRIzol homogenisiert und ebenfalls geschert. Die weiteren Schritte zur Isolierung der RNA erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers über die RNeasy Spin Columns des RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Die RNA wurde am Ende der Isolierung in 30 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration einer Lösung wurde wie die DNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 1:100–Verdünnung in nukleasefreiem Wasser bestimmt.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte ebenfalls mit dem Lambert-Beerschen Gesetz. Jedoch wurde nun der für RNA spezifische Extinktionskoeffizient von 40 µg ml<sup>-1</sup> in die Formel eingesetzt.

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

- $C_{\text{RNA}}$ : Konzentration an RNA in der Lösung [µg·ml<sup>-1</sup>]
- $E_{260}$ : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
- $\epsilon_{\text{RNA}}$ : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich 40 µg·ml<sup>-1</sup>
- $V$ : Verdünnungsfaktor, hier 100

#### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Um das Ausgangsmaterial für eine PCR zu erhalten, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit der Reversen Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Reverse Transcription Systems von Promega durchgeführt. Als Primer wurden Random Hexamer Primer eingesetzt, die an komplementären Sequenzen innerhalb der RNA-Moleküle hybridisierten und als Ausgangspunkt für die Synthese des cDNA-Stranges an der RNA-Matrize durch die Reverse

Transkriptase dienten. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	8	µl
RT-Puffer, 10 x	4	µl
dNTP-Mix, 10 mM	4	µl
<i>Random Hexamer</i> Primer, 0,5 µg/µl	1	µl
RNAsin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/µl	1	µl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/µl	0,5	µl
RNA (1 µg) in nukleasefreiem Wasser	21,5	µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde die AMV-RT durch fünfminütige Inkubation bei 95°C hitzeinaktiviert und die cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

## 2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

### 2.2.4.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Um Gesamtproteinextrakte aus Zellen zu gewinnen, wurde der Zellüberstand abgezogen und die Zellen in eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitor mit einem Schaber vom Boden der Kulturflasche bzw. Zellkulturschale gelöst. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4000 rpm wurde das Zellpellet in 60 µl eiskalten RIPA-Zelllysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die genomische DNA im Zelllysate mit Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.4.2 Präparation von Fettgewebsextrakten

Die Präparation von Gesamtproteinextrakt aus Fettgewebestücken wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Zunächst wurde 1 ml eiskalter RIPA für GentleMACS (ohne Igepal und SDS) mit Protease- und Phosphataseinhibitor versetzt und in die entsprechenden Tubes vorgelegt. Die tiefgefrorenen ca. 50 mg großen Gewebestückchen wurden überführt und mittels GentleMacs homogenisiert. Nach kurzem Abzentrifugieren (600 rpm, 4 °C, 10 Sekunden) wurden die homogenisierten Lösungen mit 100 µl Igepal (10%ig) und 5 µl SDS (20%ig) versetzt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Ultraschall (32%, jeweils 10 Sekunden) behandelt, um die genomische DNA zu Scheren. Danach wurden die Proben dreimal 10 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert und nur die klare Interphase in ein neues Cup überführt. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Methode [82]. Dabei wurden 200 µl einer 1:50-Mischung von 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure mit 10 µl einer 1:10-Verdünnung der Probe in PBS versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Proteine bilden dabei über ihr Rückgrat mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen Komplex, wobei die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Diese  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex aus, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes steigt linear mit der vorhandenen Proteinmenge an. Um die Menge an Protein in der Probe quantifizieren zu können, wird jeweils parallel eine Standardkurve mit BSA erzeugt, aus der sich die Konzentrationen der unbekannten Proben berechnen lassen.

### 2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine werden dazu mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Dadurch denaturieren die Proteine und interagieren mit SDS, wobei das SDS durch seine aliphatischen Seitenketten die Proteine partiell auffaltet. Der Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol zum SDS-Probenpuffer sorgt dafür, dass alle Disulfidbrücken in einem Peptid gespalten werden [83].

Die SDS-Polyacrylamidgele, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10 bzw. 15%igen Trenngel. Die Gellösungen wurden mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED vermischt, die die radikalische Polymerisation des Acrylamids auslösen, und nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen: zuerst unten das engmaschige Trenngel, das der Auftrennung der Proteine diene, und darauf das großporige Sammelgel mit den Taschen, in dem die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel aufkonzentriert wurden. Nachdem die Acrylamidlösungen vollständig auspolymerisiert waren, wurden die Gele in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und, sofern nicht anders angegeben, 20 µg Protein in die Taschen geladen. Zudem wurde ein Proteinstandard aufgetragen, mit dem die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophorese wurde ca. 70 min bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

#### **2.2.4.5 Coomassie-Färbung**

Bei der Coomassie-Färbung bildet der Coomassie-Farbstoff der Biosafe™ Coomassie-Lösung nicht-kovalente Komplexe mit Proteinen aus. Dabei entstehen blau-violette Banden.

Die PVDF-Membranen bzw. die Gele wurden 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Biosafe™ Coomassie inkubiert bis eine Färbung der Banden auftritt. Gegebenfalls musste die Biosafe™ Coomassie-Lösung gewechselt werden, um eine deutlichere Färbung zu bekommen. Nach der Färbung wurden die Membranen in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf Whatman Papier getrocknet.

#### **2.2.4.6 Silber-Färbung**

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, um Proteine in Acrylamidgelen nachzuweisen [84]. Dabei bilden Proteine und Silberionen einen Komplex, der durch die Reduktion mit Formaldehyd sichtbar wird. Bei dieser Reaktion werden Silberionen zu elementarem Silber reduziert, das als unlösliches braunes Präzipitat ausfällt. Dazu wurde das Gel nach der Gelelektrophorese zunächst 30 min in der Fixierlösung und anschließend 30 min in der Inkubationslösung inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte von jeweils 5 min in Wasser. Für 40 min wurde das Gel in der Silberlösung geschwenkt und erneut kurz mit Wasser gewaschen, bevor die Reduktion der Silberionen in der Entwicklerlösung erfolgte. Die Inkubation in der Entwicklerlösung erfolgt solange, bis die Proteine deutlich als braune Banden zu erkennen sind. Durch die EDTA-haltige Stopplösung wurde die Reaktion schließlich abgebrochen. Das Gel wurde kurz in Wasser gewaschen und mit der Preservierlösung haltbar gemacht.

#### **2.2.4.7 Western-Blotting**

Unter Western Blot versteht man den Transfer von Proteinen, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran, mit anschließendem immunologischem Nachweis [85]. In dieser Arbeit wurde ein Wettransfer-Verfahren angewendet, bei dem die Proteine mittels Elektrobplot auf die Membran transferiert wurden. Die Proteine werden auf eine Immun-Blot™ PVDF Membran übertragen, die vor Gebrauch kurz in Methanol und anschließend in Wettransfer-Puffer äquilibriert wurde. Die jeweils verwendeten Netze, Whatman-Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls mit Wettransfer-Puffer äquilibriert. Aus den Filterpapieren, der Membran und dem Gel wird ein „Blot-Sandwich“ aufgebaut und in die

Blot-Apparatur eingespannt. Bei einer Spannung von 80 V erfolgt der Transfer der Proteine auf die Membran, währenddessen der Transferpuffer unter Kühlung mit einem Magnetrührer ständig gemischt wird.

Um für die anschließende Detektion der Proteine mittels Antikörper unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde in Blockierlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen à 15 min mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der Antikörperlösung. Die Inkubation erfolgte meist über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde im Anschluss gewaschen um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert war, in 10 ml Blockierlösung. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 verdünnt, für 60 min inkubiert und die Membran anschließend wieder gewaschen. Zur Detektion der HRP wurde die ECL Plus Western Blotting Detection Reagent Lösung verwendet. Die beiden Reagenzien der ECL-Lösung wurden laut Herstellerangaben gemischt und 1 ml sofort auf die Membran gegeben. Nach 5 min wurde überschüssiges Reagenz entfernt und die Membran in einer Klarsichtfolie in die lichtdichte Filmkassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit Hyperfilm ECL™, abhängig von der Intensität des Signals über einen Zeitraum von 1 min bis zu 60 min.

#### **2.2.4.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Mit dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Nachweisprinzip des ELISAs beruht, analog zum Western Blotting, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (Capture AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (Detection AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, dass ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch nachgewiesen werden. Über eine Standardkurve lässt sich somit die Proteinkonzentration der Proben berechnen. Man bezeichnet diese Art des ELISAs als Sandwich-ELISA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DuoSet® ELISA Development System Kits von R&D Systems zur Quantifizierung von Adiponektin, Chemerin, Glukagon und IL-6, sowie der Insulin ELISA der Firma Mercodia entsprechend den Angaben der Hersteller verwendet.

#### **2.2.4.8.1 cAMP ELISA**

Für die Bestimmung der cAMP Konzentrationen der verschiedenen Fettdepots, wurden die ca. 100 mg großen Gewebstücke für 10 min bei RT mit 0,1 M HCl inkubiert und anschließend zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. In den gewonnenen Überständen wurden die cAMP Konzentrationen mittels direct cAMP ELISA der Firma EnzoLife Science ermittelt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

#### **2.2.5 Oil Red O Färbung**

Der Nachweis differenzierter, lipidhaltiger Zellen erfolgte durch die Öl-Red-O-Färbung. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer PBS-Lösung gewaschen und danach für 5 min in 10 %igem Formaldehyd bei RT fixiert. Die Zellen wurden dann mit 60%igem 2-Propanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Für die Lipidfärbung wurden die Zellen für eine Stunde mit der Öl-Red-O-Färbelösung inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen viermal mit Wasser gewaschen. Unter dem Mikroskop waren die Lipidtropfen mit ihrer leuchtend roten Färbung deutlich erkennbar und konnten dokumentiert werden.

#### **2.2.6 Immunfluoreszenz**

Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von zellulären Proteinen wurden 3T3-L1 Zellen in 6-well-Platten auf sterilen Deckgläschen kultiviert und zu reifen Adipozyten differenziert. Die bewachsenen Deckgläschen wurden vorsichtig entnommen und dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach oben in neue, bei -20°C vorgekühlte und mit je 2 ml Methanol befüllte 6-well-Platten überführt und die Zellen bei -20°C für 15 min fixiert. Nach Absaugen des Methanols und Lufttrocknen konnten die fixierten Zellen bei -20°C gelagert oder sofort für die Immunfärbung verwendet werden.

Der erste Schritt der Immunfärbung erfolgte durch Inkubation mit 2 bis 3 ml Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen je einmal mit PBS gewaschen und mit PBST überschichtet. Nach Absaugen des PBST wurde die Fläche um das Deckgläschen herum trocken gewischt und 100 µl einer Primärantikörperlösung vorsichtig aufgetragen. Nach der Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min und wiederum eine Benetzung mit PBST. Danach wurden 100 µl einer Sekundärantikörperlösung zusammen mit 4,6-Diamidino-

2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Roche) zur Färbung der Kerne aufgetragen und die Zellen lichtgeschützt 1 h bei 37°C inkubiert. In anderen Experimenten wurden noch zusätzlich die Lipide mit BODIPY bzw. das ER mit ER-Tracker angefärbt. Nach viermaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die Deckgläschen vorsichtig entnommen, am Rand trocken getupft und mit Hilfe eines speziellen Trägermediums für Fluoreszenzfarbstoffe mit der bewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert und bei Raumtemperatur lichtgeschützt getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und eines digitalen Bildverarbeitungssystems (AxioVision Software der Firma Zeiss, Unterstützung durch Frauenbeauftragtenförderung zur Teilnahme am AxioVision Basis Kurs I) ausgewertet oder bei 4°C gelagert.

### **2.2.7 Histologische Untersuchungen**

Die in 4 %iger PBS-gepufferter Formalinlösung konservierten Proben wurden in Paraffin eingebettet und mit einem Microtom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in einem 45°C warmen Wasserbad gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezogen und getrocknet.

#### **2.2.7.1 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Hämalaun färbt als basischer Farbstoff saure Komponenten blau an, während der saure Farbstoff Eosin basische Komponenten rot färbt. Kerne erscheinen dadurch in der HE-Färbung blau, das Zytoplasma, das Bindegewebe und die Muskulatur rötlich. Die 5 µm dünnen Schnitte wurden zweimal in Histol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Nach einem Waschgang mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 2 min und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min. Nach Gegenfärbung mit Eosin für 5 min wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Histol inkubiert. Um die Schnitte zu konservieren, erfolgte das Eindecken in Entellan.

#### **2.2.7.2 Sirius-Red-Färbung**

Die Bindegewebsfärbung mit Sirius Red kann Informationen über den Fibrosegard liefern, da in dieser Färbetechnik Bindegewebe rot und alle anderen Gewebsarten grün erscheinen.

Zunächst erfolgte wiederum die Entparaffinierung der Schnitte in Histol und die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal für 5 min in 1 %iger Tween-PBS-Lösung und für weitere 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die 30 minütige Inkubation im Farbgemisch, bestehen aus 100 mg Sirius Red Reagens, sowie 100 mg Fast Green FCF und 100 ml Picrinsäure. Da es sich bei den Farbstoffen um lichtempfindliche Substanzen handelt, erfolgten die Herstellung des Farbgemisches und die Inkubation lichtgeschützt. Nach Ablauf der Inkubationszeit schlossen sich ein weiterer Waschgang in destilliertem Wasser, die Entwässerung in einer absteigenden Alkoholreihe, sowie das Eindecken in Entellan an.

### **2.2.7.3 Immunhistochemie**

Die Schnitte wurden in Histol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Citratpuffer für 20 min in der Mikrowelle aufgekocht. Das Gefäß musste dann auf RT abkühlen, bevor mit den Schnitten weitergearbeitet werden konnte. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen. Hierauf wurde zum Blockieren der endogenen Peroxidase, welche zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führen kann, 30%ige Wasserstoffperoxidlösung für 10 Minuten auf die Schnitte aufgebracht. Danach wurde wiederum mit PBS gewaschen. Um die Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern wurden die Schnitte mit dem Proteinblockierungsreagenz für 30 Minuten bei RT beschichtet. Anschließend wurde der primäre Antikörper bzw. als Negativkontrolle das Antikörperverdünnungsmedium aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal für je 10 Minuten mit 0,05 %iger Tween-TBS-Lösung gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (Biotin) auf die Schnitte aufgebracht und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte gewaschen und die Streptavidin-Peroxidase Lösung auf die Schnitte pipettiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wurde das DAB-Substrat zugegeben. Sobald sich die Schnitte rot-braun färbten, wurden sie mit Aquadest gut gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zum Eindecken der Schnitte wurde Entellan verwendet.



### **2.2.8 Bestimmung von Triglyzeriden in Seren und Zell- und Gewebslysaten**

Triglyzeride sind Ester aus Glycerol und drei langkettigen Fettsäuren. Der hier verwendete Test zur Bestimmung der Triglyzeride ist ein enzymatischer, colorimetrischer Test und beruht auf folgendem Prinzip: Die Triglyzeride werden mittels Lipoproteinlipase in Glycerol und Fettsäuren gespalten. Das Glycerol wird zusammen mit ATP,  $Mg^{2+}$  und Glycerolkinase zu Glycerol-3-phosphat und ADP umgesetzt. Das erhaltene Glycerol-3-phosphat wird mit Sauerstoff und Glycerolphosphatoxidase zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Wasserstoffperoxid, 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol werden mittels Peroxidase zum roten 4-(p-Benzoquinon-monoimino)-phenazon, Wasser und Salzsäure umgewandelt. Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffs ist direkt proportional zur Triglyzeridkonzentration und kann photometrisch gemessen werden. Durchgeführt wurde dieser Test mit Seren, Zell- und Gewebslysaten nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.2.9 Bestimmung von Cholesterin in Seren und Zell- und Gewebslysaten**

Der hier verwendete, colorimetrische, enzymatische Test beruht darauf, dass Cholesterinester mittels Cholesterinesterase in Cholesterin und Fettsäure gespalten werden. Das nun freie Cholesterin wird mit Cholesterinoxidase zu Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das erhaltene Wasserstoffperoxid wird mit 4-Chlorphenol, 4-Aminophenazon und Peroxidase zu einem Chinoniminfarbstoff umgesetzt, dessen Konzentration proportional zur Cholesterinkonzentration ist und photometrisch gemessen werden kann. Dieser Test wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit Seren, Zell- und Gewebslysaten durchgeführt.

### **2.2.10 Bestimmung von freien Fettsäuren in Seren und Zellüberständen**

Der zur Bestimmung der freien Fettsäuren verwendete colorimetrische Test der Firma Roche beruht auf folgendem Prinzip: In Gegenwart von Acyl-CoA Synthetase und ATP werden freie Fettsäuren in Acyl-CoA, AMP und Pyrophosphat umgesetzt. Acyl-CoA reagiert mit Sauerstoff ( $O_2$ ) in Anwesenheit von Acyl-CoA Oxidase zu Enoyl-CoA. Das freiwerdende Wasserstoffperoxid konvertiert in Gegenwart der Peroxidase 2,4,6-Tribromo-3-Hydroxy-Benzoessäure und 4-Aminoantipyrin zu einem roten Farbstoff, welcher bei 546 nm gemessen werden kann. Der Test wurde nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.11 Bestimmung von freiem Glyzerin in Seren und Zellüberständen**

Zur Untersuchung der Lipolyserate von Zellen wurde der Free Glycerol Assay Kit der Firma BioCat verwendet. Damit lässt sich in Zellüberständen und Seren vorhandenes freies Glyzerol nachweisen, indem es enzymatisch oxidiert wird. Das entstehende Produkt reagiert im Anschluss mit dem Reagenz des Kits und bildet einen Farbkomplex aus, der bei 570 nm photometrisch detektiert werden kann. Mit Hilfe der Standardkurve lässt sich die Menge an Glyzerol bestimmen.

### **2.2.12 Bestimmung von Glukose in Seren**

Die Glukosemenge wurde im Serum mit dem QuantiChrom™ Glucose Assay Kit von Biotrend gemessen. Dabei handelt es sich um eine Verbesserung der o-Toluidin Method, bei der Glukose mit o-Toluidin unter Hitze einen grünen Farbstoff bildet, der photometrisch bestimmt werden kann. Die OD bei 630 nm ist direkt proportional zur Glukosekonzentration in der Probe. Der Test erfolgte wie im Protokoll des Herstellers beschrieben.

### **2.2.13 Koimmunpräzipitation**

Zur Identifizierung der Interaktionspartner von SNTB2 wurde der IP/Co-IP Kit Pierce Protein A/G Magnetic der Firma Thermo Scientific verwendet. Hierfür wurden 3T3-L1 Präadipozyten und reife Adipozyten mit eiskaltem, im Kit enthaltenen IP Lyse/Waschpuffer für 5 min lysiert. 500 µg des jeweils gewonnenen Zelllysats wurden anschließend mit 10 µg des spezifischen Antikörpers (polyklonaler SNTB2 AK bzw. monoklonaler Caveolin-1 AK) für 2 h bei RT inkubiert, um einen Immunkomplex zu bilden. Daraufhin folgte die Bindung der Beads an den Antigen/Antikörper Komplex. 25 mg der vorher gewaschenen Protein A/G Magnetic Beads wurden mit dem Komplex 1 h bei RT inkubiert, im Anschluss mehrmals gewaschen und schließlich mittels Elutionspuffer eluiert. Die Eluierung erfolgte mittels einer Erniedrigung des pH-Wertes und somit mussten die erhaltenen Proben nachträglich neutralisiert werden. Die Eluate wurden mittels Immunoblots analysiert. Zur Überprüfung der Immunpräzipitation wurden auch verschiedene Kontrollansätze ohne Lysat bzw. ohne Antikörper durchgeführt.

### **2.2.14 Adipozytenisolierung**

Die verschiedenen Fettdepots von 3 männlichen C57BL/6 Mäusen wurden freipräpariert und sofort mit eiskalter 0,9 %iger NaCl Lösung gewaschen. Die Fettgewebe wurden in ca. 20 mg große Stücke zerteilt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad mit Kollagenasepuffer (2.1.8.6) inkubiert [86]. Während der Kollagenasebehandlung wurden die Ansätze alle 30 min gevortext und im Anschluss durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert. Mittels Stopplösung wurde die Kollagenase inaktiviert. Um die Zellen zu separieren wurde die Suspension für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die reifen Adipozyten, während das Pellet aus Zellen der stroma-vaskulären Fraktion bestand. Dieses Zellpellet wurde mit Erythrozytenpuffer behandelt und mit DMEM Kultivierungsmedium (2.1.9.1) mehrmals gewaschen und auf Zellkulturschalen ausgesät. Nach 2 tägiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet und in Westernblotanalysen verwendet.

### **2.2.15 Fettgewebeskulturen**

Jeweils 5 SNTB2 -/- und Wildtyp Tiere wurden per Genickbruch getötet und das subkutane, epididymale und perirenal Fettgewebe entnommen. Die Fettdepots wurden sofort in Petrischalen, die mit Natriumchloridlösung gefüllt waren, überführt und dort in etwa 20 mg große Läppchen zerteilt. Diese Fettgewebsstückchen wurden in vitro in Adipozyten Anzuchtmedium für 24 h im Brutschrank bei 37°C kultiviert und anschließend mit 1 µg/ml LPS bzw. H<sub>2</sub>O für 24 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gewebsstückchen gewogen und in eiskaltem RIPA mit dem GentleMACS homogenisiert. Die Überstände dienten zur Messung von IL-6 mittels ELISA, während der Proteingehalt der Lysate und die Gewichte der Fettstückchen zur Normalisierung der mit dem ELISA gemessenen Werte verwendet wurden.

### **2.2.16 Tiermodelle**

Alle Tierversuche wurden entsprechend den ethischen Richtlinien, mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Regensburg und der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt. Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und wurden in einem 12 h Tag-/Nacht-Zyklus bei geregelter Luftfeuchtigkeit und einer konstanten Raumtemperatur von 22°C gehalten.

### **2.2.16.1 Syntrophin Knock-out Mäuse**

Die beta2-Syntrophin defizienten Mäuse und die entsprechenden Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marvin E. Adams (Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle) zur Verfügung gestellt. Im Alter von 3 Monaten wurden die Tiere zur Zucht verwendet, oder für 24 Wochen mit einer Hochfettdiät (Ssniff EF R/M nach D12451 (II) modifizierte Hochfettdiät) gefüttert. Während der Hochfettdiät wurde wöchentlich das Gewicht der Tiere bestimmt. Die Gewebe und Seren von männlichem Tiere, die die Nacht vor der Tötung kein Futter erhalten hatten, wurden verwendet.

### **2.2.16.2 Intraperitonealer Glukose- und Insulintoleranztest**

Der Intraperitoneale Glukosetoleranztest (IPGTT) und der Insulintoleranztest (IPITT) wurden von Dr. Markus Neumeier durchgeführt. Dafür wurde den Tieren nach 16 h Fasten für den IPGTT 1 mg Glukose oder für den IPITT 1 mU Insulin pro g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Es wurden sieben Wildtyp Tiere und acht SNTB2 -/- Tiere, welche für 24 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden, untersucht. Den Tieren wurden zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90 und 120 min nach der Glukose- bzw. Insulininjektion unter Betäubung retrobulbäres Blut entnommen und davon die Blutglukosespiegel bestimmt.

### **2.2.16.3 Intraperitonealer Insulininjektion**

In Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Kopp wurden 8 Wildtyp und 7 SNTB2 -/- Tiere mit 1 mU Insulin pro g Körpergewicht bzw. mit H<sub>2</sub>O intraperitoneal gespritzt. Nach 5 min wurden die Tiere anästhesiert und mittels Genickbruch getötet. Gewonnenes Herzblut und Gewebeproben wurden sofort weiterverarbeitet.

### **2.2.16.4 Postprandiale Untersuchungen**

Acht Wildtyp und sieben SNTB2 -/- Tiere wurden über Nacht gefastet, anschließend für 2 h gefüttert und unter Betäubung retrobulbäres Blut entnommen.

#### **2.2.16.5 ob/ob Mäuse**

Jeweils fünf 10 Wochen alte männliche Leptin defiziente ob/ob Mäuse (B6.V-Lep<sup>ob</sup>/J) und die entsprechenden Wildtyp Kontrolltiere wurden von The Jackson Laboratory bezogen. Nach einer dreiwöchigen Akklimatisierungszeit wurden die Tiere über Nacht nüchtern gesetzt, anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Herzblut wurde gewonnen und die verschiedenen Fettgewebe und die Leber wurden präpariert. Die Gewebe wurden sofort für die Protein- und RNA-Gewinnung weiterbehandelt.

#### **2.2.16.6 Wildtyp C57BL/6 Mäuse**

Sieben männliche C57BL/6 Mäuse wurden im Alter von 7 Wochen von Charles River bezogen und 4 Wochen zur Akklimatisierung gehalten. Anschließend wurden die Tiere über Nacht nüchtern gesetzt, anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Herzblut wurde gewonnen und die verschiedenen Fettgewebe und die Leber wurden aus den Mäusen präpariert und sofort für die RNA-Gewinnung verarbeitet.

Des Weiteren wurden zwei 5 Monate alte männliche C57BL/6 Mäuse aus Eigenzucht für Versuche verwendet. Die beiden Tiere wurden anästhesiert und getötet. Neben dem Herzblut wurden die Leber, die Bauchspeicheldrüse, die Milz, das Gehirn, der Skelettmuskel und die verschiedenen Fettdepots gewonnen. Die Gewebe wurden für die Protein-Gewinnung weiterverarbeitet.

#### **2.2.17 Quantifizierung der Immunoblotexperimente**

Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ wurden die Banden der Westernblotanalysen quantifiziert.

#### **2.2.18 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Auswertungen wurden für gepaarte Proben mittels des Student's t-test in Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Für nicht gepaarte Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Unterschiede in der Adipozytengröße wurden mittels der Vier Felder Tafel berechnet. Dabei wurde ein p-Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant definiert.

---

Zur graphischen Darstellung der erarbeiteten Ergebnisse wurden die Daten als Boxplots dargestellt. Die Boxplots bestehen aus Rechtecken, die 50 % der Werte enthalten. Die Werte werden hierbei in Viertel aufgeteilt, wobei das 1. Quartil bei 25 %, das 2. Quartil bei 50 % (dem Median) und das 3. Quartil bei 75 % der Daten liegt. Die Whiskers stellen die Extremwerte dar. Ausreisser werden durch ein Sternchen, oder ein ovales Zeichen dargestellt. Die entsprechenden Diagramme wurden in SPSS 19 erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 SNTB2 Expression in murinen Adipozyten

Die Funktion des molekularen Adapterproteins SNTB2 wurde bisher fast ausschließlich im Skelettmuskel untersucht. Die Expression von SNTB2 im Fettgewebe wurde bisher noch nicht beschrieben und konnte erstmals in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [74]. Auf Proteinebene sollte nun untersucht werden, wie sich die Expression von SNTB2 in verschiedenen Fettdepots im Vergleich zu anderen Geweben darstellt. Immunoblots mit verschiedenen Geweben von zwei männlichen, 5 Monate alten C57BL/6 Mäusen wurden durchgeführt (Abbildung 5 A).

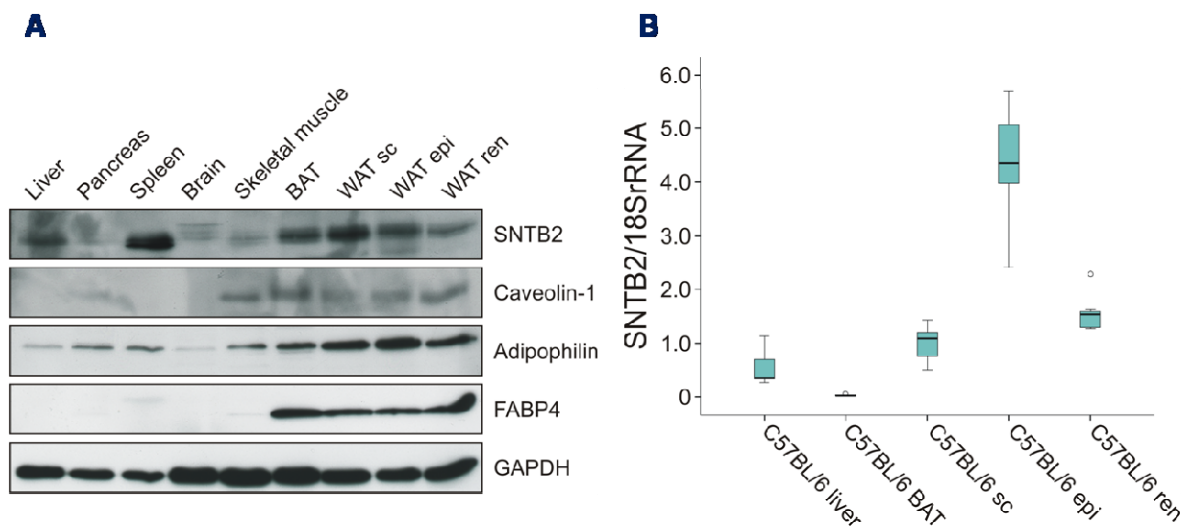


Abbildung 5: SNTB2 Expression in verschiedenen murinen Geweben.

- (A) Analyse der Proteinexpression von SNTB2, Caveolin-1, Adipophilin und FABP4 in verschiedenen Geweben von C57BL/6 Mäusen. Die GAPDH diente als Ladungskontrolle.
- (B) Analyse der mRNA-Expression von SNTB2 in den verschiedenen Fettdepots und der Leber von sieben C57BL/6 Tieren. Die Expression der 18S rRNA wurde für die Normalisierung verwendet.

SNTB2 zeigte im braunen (BAT), subkutanen (sc), epididymalen (epi) und perirenen (ren) Fett eine höhere Expression als im Skelettmuskel, dem Gehirn und dem Pankreas. Desweiteren konnte SNTB2 in der Leber und der Milz nachgewiesen werden. Proteine, welche überwiegend im Fettgewebe vorkommen wie Caveolin-1, Adipophilin und FABP4 wurden ähnlich stark in den verschiedenen Fettgeweben exprimiert.

Die SNTB2 mRNA ist in den weißen Fettgewebsdepots im Vergleich zum braunen Fett und der Leber hoch exprimiert (Abbildung 5 B). Das Fettgewebe besteht aus unterschiedlichen Zelltypen. Neben den reifen Adipozyten und deren Vorläuferzellen befinden sich hier auch

nicht-adipozytäre Zellen, welche als stroma-vaskuläre Zellfraktionen (SVF) bezeichnet werden. Die Zellen der stroma-vaskulären Fraktion wurden aus den verschiedenen Gesamtfettdepots isoliert und Immunoblotanalysen durchgeführt (Abbildung 6).

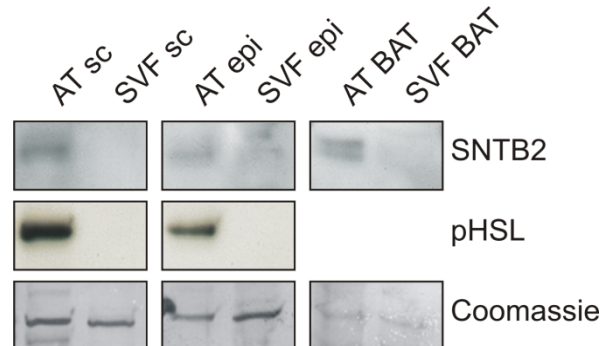


Abbildung 6: SNTB2 und pHSL in Lysaten aus Gesamtfett und deren stroma-vaskuläre Zellfraktionen. Die Coomassiefärbung diente als Kontrolle der Beladung.

SNTB2 wurde ebenso wie pHSL in den weißen Fettdepots nachgewiesen. In der SVF werden SNTB2 und pHSL nur wenig exprimiert. Auch im braunen Fett zeigt die SVF keine nennenswerte SNTB2 Expression. Als Hauptquelle der SNTB2 Expression können folglich die Adipozyten des Fettgewebes angesehen werden.

### 3.2 Expression und Funktion von SNTB2 in 3T3-L1 Zellen

3T3-L1 Fibroblasten werden häufig zur Untersuchung der Adipogenese und für funktionelle Analysen verwendet. In vitro lassen sich die 3T3-L1 Zellen zu reifen Adipozyten differenzieren, mit vielen charakteristischen Eigenschaften reifer Adipozyten [87-90]. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass SNTB2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stark während der Adipogenese induziert wird [74]. In dieser Arbeit wurde zudem das Expressionsmuster von Caveolin-1, der Lipidtropfen-assoziierten Proteine Adipophilin, Perilipin und TIP47 und der Lipase HSL untersucht (Abbildung 7).



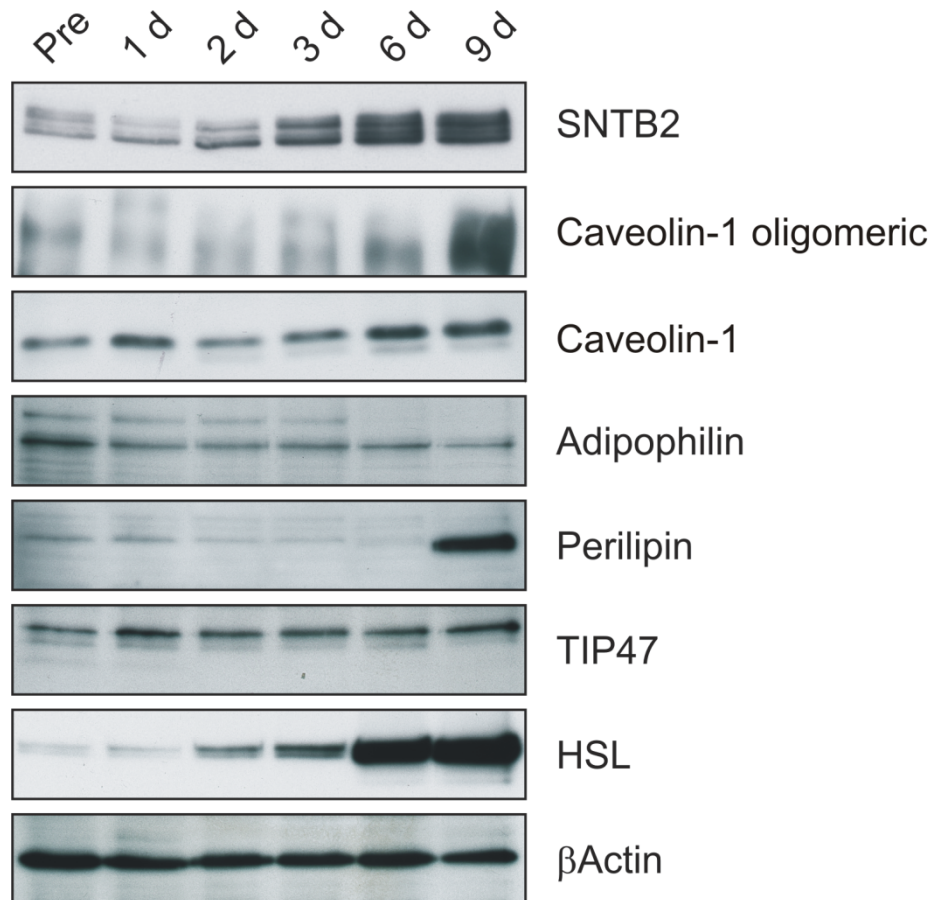


Abbildung 7: SNTB2, Caveolin-1 in oligomerer und monomerer Form, Adipophilin, Perilipin, TIP47 und HSL während der Adipozytendifferenzierung in 3T3-L1 Zellen. βActin diente als Beladungskontrolle.

Während Adipophilin hauptsächlich in Präadipozyten exprimiert wurde, war Perilipin beinahe ausschließlich in reifen Adipozyten zu finden. TIP47 wurde während der Adipogenese nicht reguliert. Caveolin-1 wurde sowohl in seiner oligomeren als auch in seiner monomeren Form in reifen Adipozyten stark exprimiert. Die Lipase HSL wurde wie SNTB2 während der Differenzierung induziert.

### 3.2.1 Lokalisation von SNTB2 in 3T3-L1 Fibroblasten

SNTB2 wird, wie in Abbildung 7 dargestellt, bereits in Fibroblasten exprimiert. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie konnte dies bestätigt werden (Abbildung 8). RNA-Interferenz Experimente bewiesen, dass der Antikörper gegen panSyntrophin (panSNT) praktisch ausschließlich SNTB2 färbt (Daten nicht gezeigt) und somit konnte die Immunfluoreszenzfärbung von panSNT zur Untersuchung von SNTB2 in Fibroblasten verwendet werden.

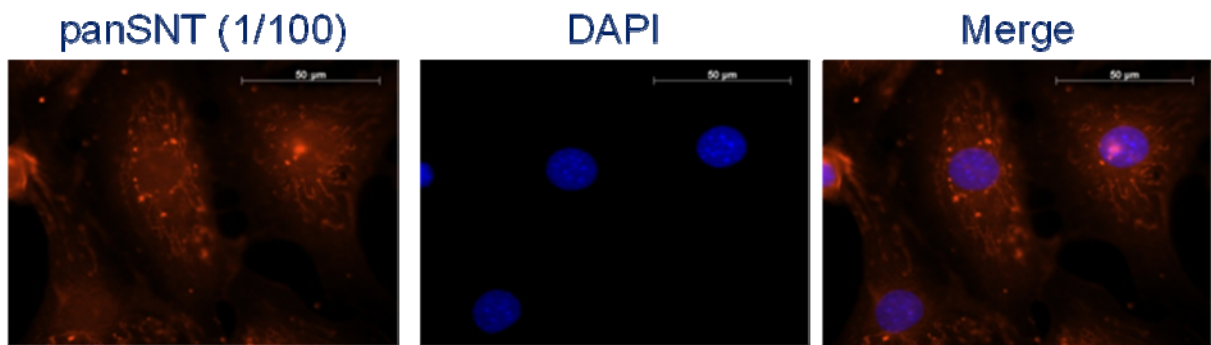


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von panSyntrophin in Fibroblasten. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

SNTB2 war im Zytoplasma lokalisiert und bildete hier sowohl vesikelförmige als auch filamentartige Strukturen aus (Abbildung 8, Abbildung 9). Färbungen für Proteine des Zytoskeletts -  $\beta$ Actin und  $\alpha$ Tubulin - konnten allerdings keine eindeutige Überlagerung mit SNTB2 aufzeigen (Abbildung 9). Obwohl die Überlagerung der  $\alpha$ Tubulin und der SNTB2 Einzelfärbungen auf eine Kolo-kalisation schließen lassen könnte, waren die filamentartigen Strukturen nicht dieselben.

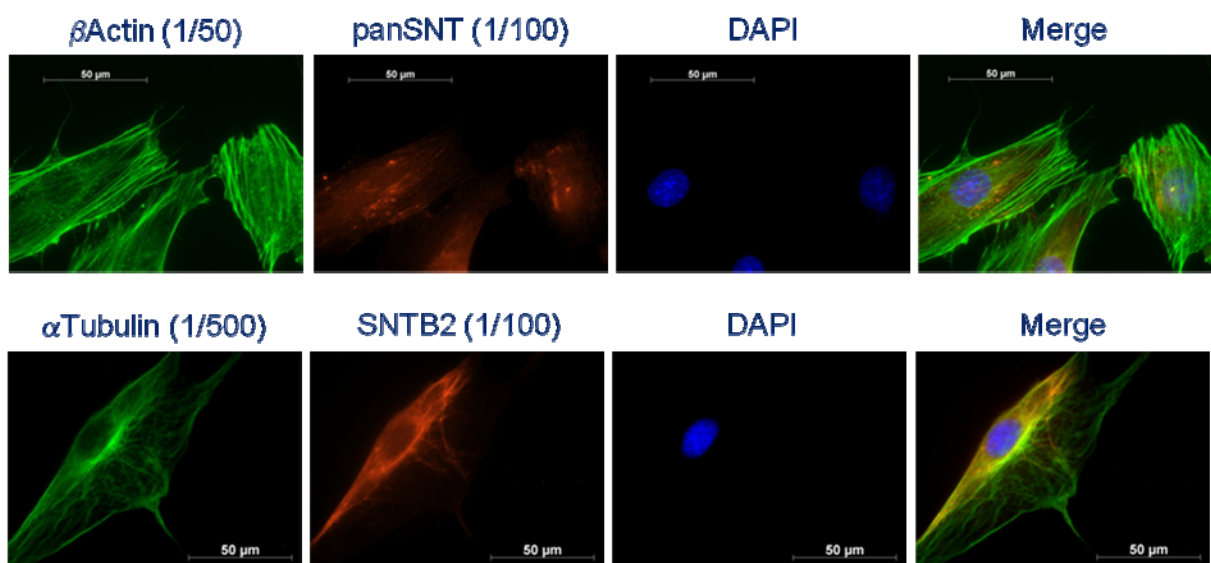


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Mikrofilamenten ( $\beta$ Actin) und Mikrotubuli ( $\alpha$ Tubulin) mit panSNT und SNTB2 AK. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

Die labyrinth-ähnliche Struktur der SNTB2 Färbung veranlasste außerdem Untersuchungen zu einer möglichen Lokalisation von SNTB2 im Endoplasmatischen Retikulum. Mittels ER-Tracker konnte das Endoplasmatische Retikulum angefärbt und eine Kofärbung mit SNTB2 durchgeführt werden. Hier zeigte sich keine überzeugende Überlagerung der Einzelfärbungen (Abbildung 10).

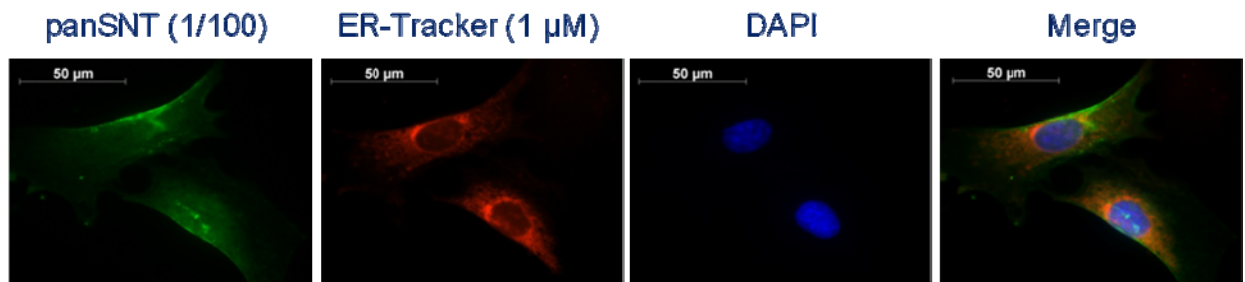


Abbildung 10: Lokalisation von panSNT in Fibroblasten. Das Endoplasmatische Retikulum wurde mittels ER-Tracker gefärbt.

Neben der Ausbildung filamentartiger Anordnungen zeigte die SNTB2 Färbung auch vesikelförmige Strukturen auf. Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen der mitochondrialen Matrix (SOD2), der Lysosomen (LAMP1) und der Endosomen (EEA1) zeigten allerdings keinerlei Überlagerung mit der SNTB2 Färbung (Abbildung 11).

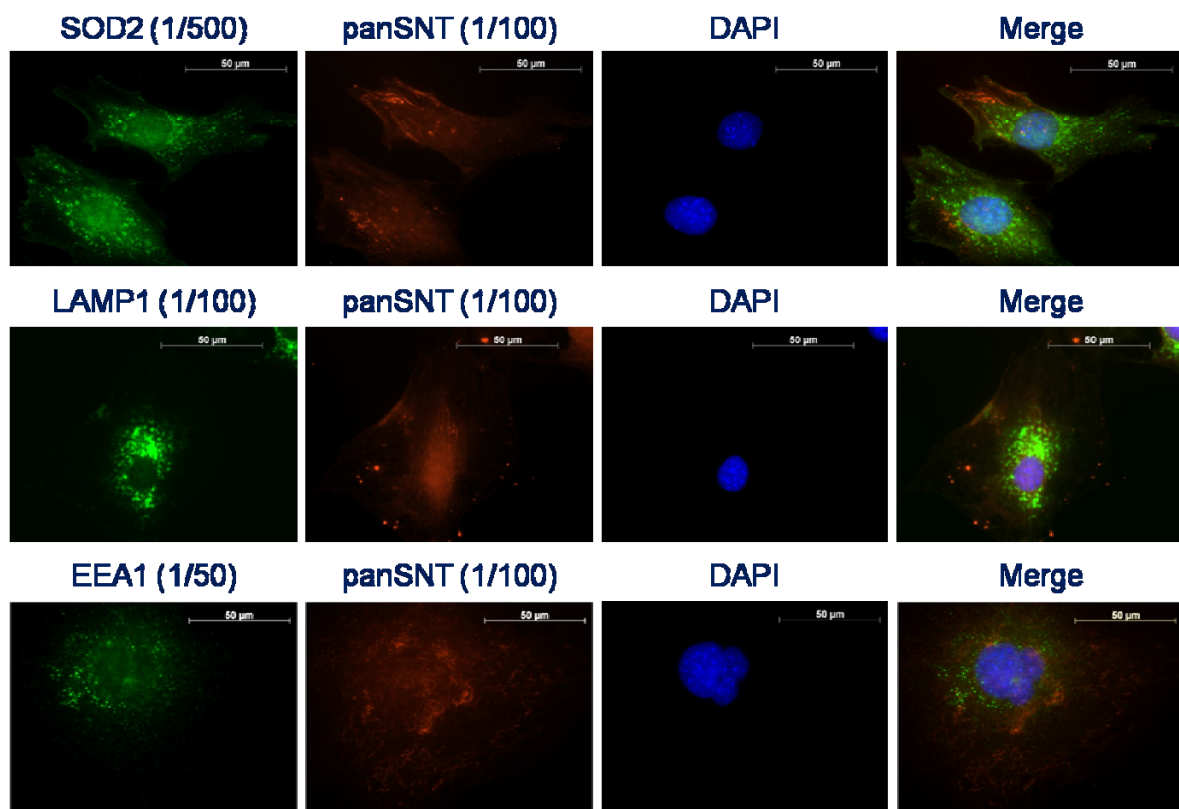


Abbildung 11: Lokalisation von SOD2 als Protein der mitochondrialen Matrix, LAMP1 als Lysosomenmarker, EEA1 als Endosomenmarker und panSNT in 3T3-L1 Fibroblasten.

### 3.2.2 Funktion von SNTB2 3T3-L1 Fibroblasten

Um den Einfluss von SNTB2 auf die Funktion der 3T3-L1 Zellen detaillierter zu untersuchen, wurden in den 3T3-L1 Fibroblasten RNA-Interferenz Experimente

durchgeführt. Mittels siRNA konnte ein Knockdown von SNTB2 durchgeführt werden (Abbildung 12).

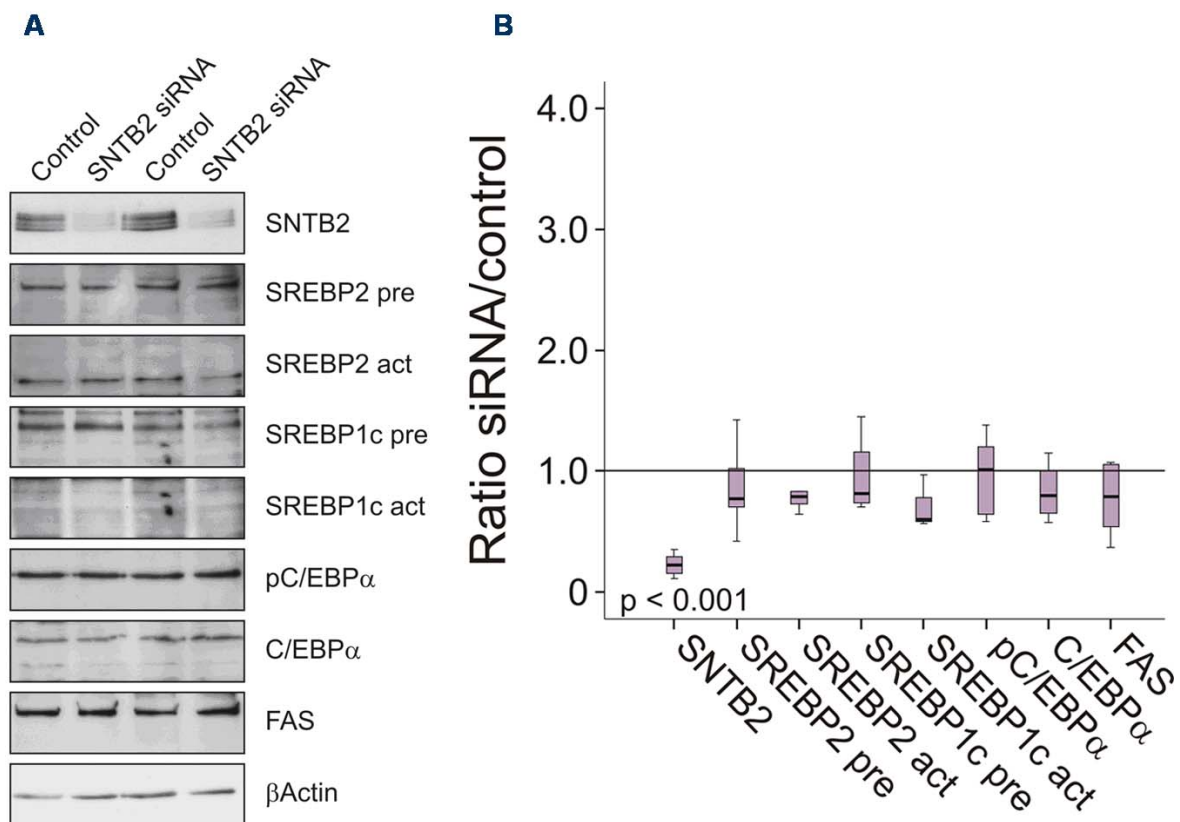


Abbildung 12: SNTB2 Knockdown in 3T3-L1 Fibroblasten mittels SNTB2 siRNA bzw. Kontroll siRNA (Control).

(A) Westernblotanalyse auf die Proteinexpression von SNTB2, SREBP1c und SREBP2 (Vorläuferform; pre und aktive Form; act.) , C/EBPα und FAS. βActin diene als Beladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von SNTB2, SREBP1c und 2, C/EBPα und FAS in den in A beschriebenen Zelllysaten von 4 bis 10 unabhängigen Versuchen. Die Normalisierung erfolgte gegen βActin.

Der Knockdown von SNTB2 zeigte keinen Einfluss auf eine Reihe von Proteinen, welche für die Adipogenese der 3T3-L1 Zellen eine wichtige Rolle spielen, wie SREBP1c und SREBP2, C/EBPα und FAS. Des Weiteren hatte der Knockdown auch keine toxische Wirkung auf die Zellen, sodass es zu keinem erhöhten Zelltod oder einer erhöhten Apoptoserate kam. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und die Apoptoserate mittels Caspase 3/7 Assays überprüft. 48 h nach der Transfektion war allerdings eine reduzierte Lebendzellzahl in den Zellen mit SNTB2 Knockdown zu beobachten, wie in Abbildung 13 dargestellt ist.

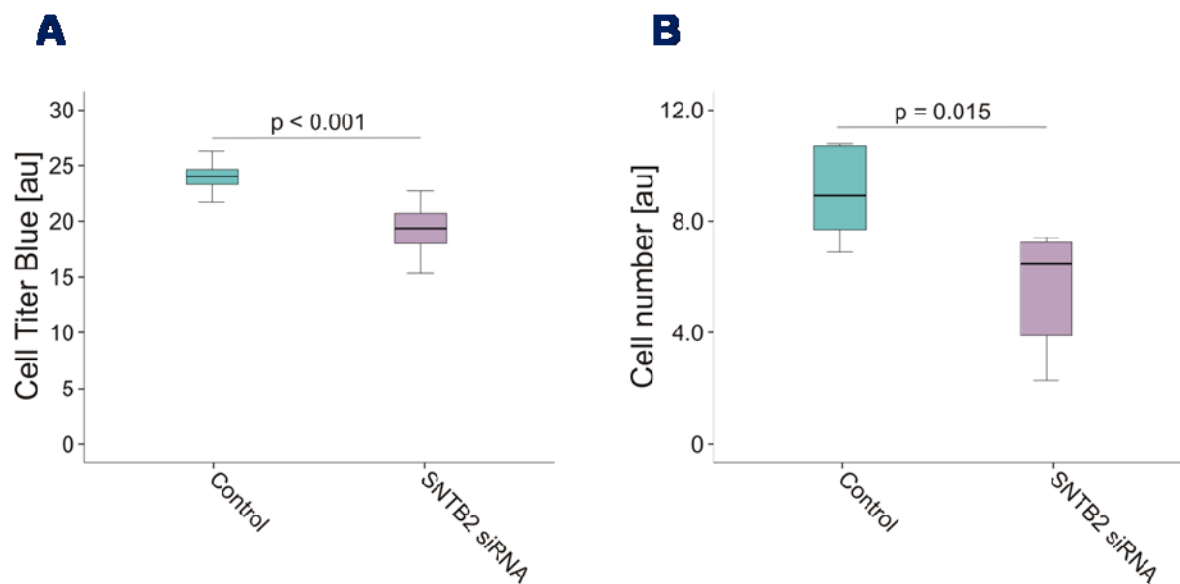


Abbildung 13: Untersuchungen zum Überleben der SNTB2 siRNA transfizierten Zellen.  
 (A) Fluoreszenzmessungen des Cell Titer Blue Reagenz in lebenden Zellen.  
 (B) Anzahl der Zellen in Kontroll und SNTB2 siRNA behandelten Zellen.

Der Knockdown von SNTB2 in Fibroblasten führt somit zu einer verringerten Zellzahl obwohl nicht mehr Zellen sterben, sodass man von einer reduzierten Proliferation der Zellen ausgehen kann.

### 3.2.3 Lokalisation und Funktion von SNTB2 in 3T3-L1 Adipozyten

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals nachweisen, dass SNTB2 stark in reifen 3T3-L1 Adipozyten exprimiert ist [74]. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine zytoplasmatische und membranständige Lokalisation von SNTB2 in reifen Adipozyten (Abbildung 14).

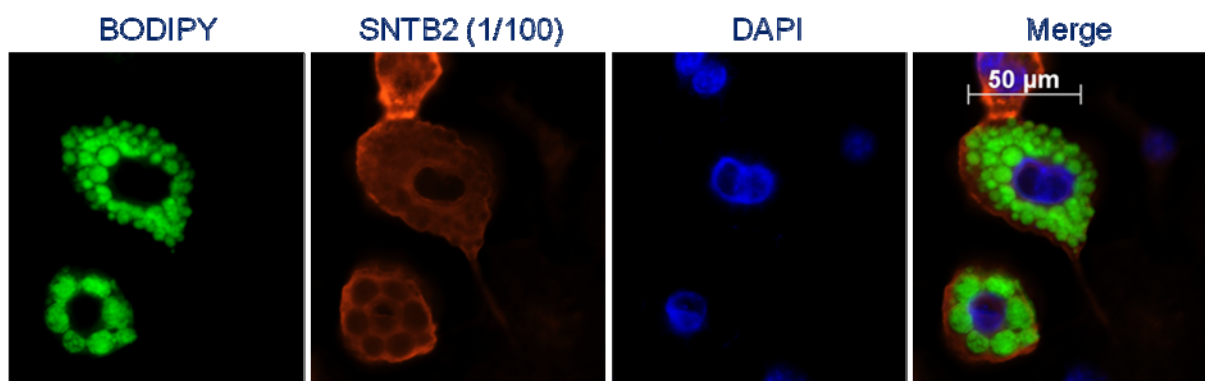


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von SNTB2 in reifen Adipozyten. Neutrale Lipide wurden mittels BODIPY und der Zellkern mittels DAPI gefärbt.



Zudem konnte ich in meiner Diplomarbeit nachweisen, dass der Knockdown von SNTB2, durchgeführt mittels siRNA Transfektion in 3T3-L1 Präadipozyten und anschließender Differenzierung zu reifen Adipozyten, zur Ausbildung eines ausgeprägten Phänotyps führte [74]. Die Zellen beinhalteten wesentlich weniger, dafür deutlich größere Lipidtropfen als die Kontrollzellen. Abbildung 15 zeigt reife 3T3-L1 Zellen welche mit fettspezifischen Oil Red O gefärbt wurden.

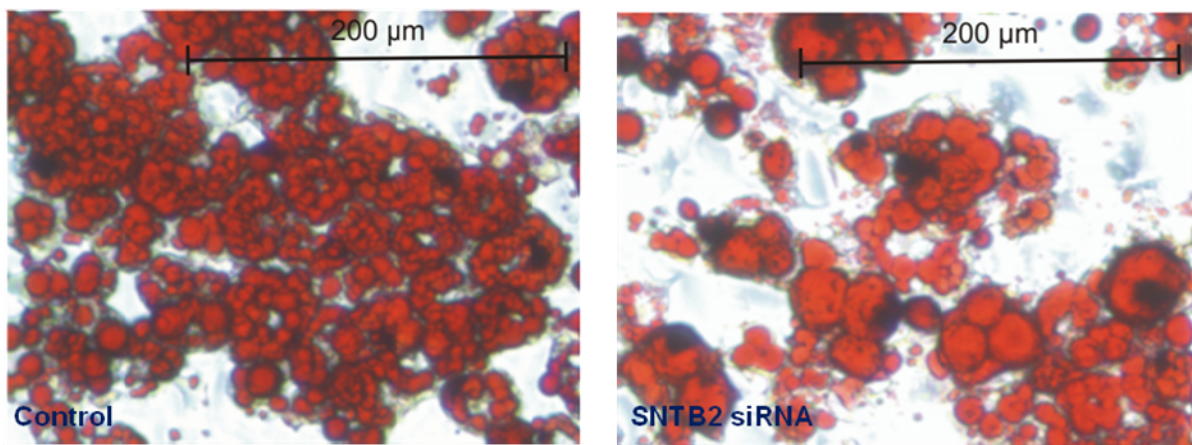


Abbildung 15: Oil Red O Färbung in reifen 3T3-L1 Adipozyten nach Transfektion mit Kontroll und SNTB2 siRNA als Präadipozyten und anschließender Differenzierung.

Neben der Ausbildung großer Lipidtropfen, führte der Knockdown von SNTB2 auch zu einer verminderten Speicherung von Triglyzeriden in den Zellen [74].

### 3.3 SNTB2 Knockdown in primären humanen Adipozyten

Erstmals wurde die Expression von SNTB2 in isolierten primären humanen Adipozyten nachgewiesen. Wie in der murinen Zelllinie 3T3-L1 führte auch hier der Knockdown zur Ausbildung von weniger, größeren Lipidtropfen. In Abbildung 16 veranschaulichen Immunoblots den Knockdown (A) und lichtmikroskopische Aufnahmen den deutlichen Phänotyp mit den großen Lipidtropfen (B).

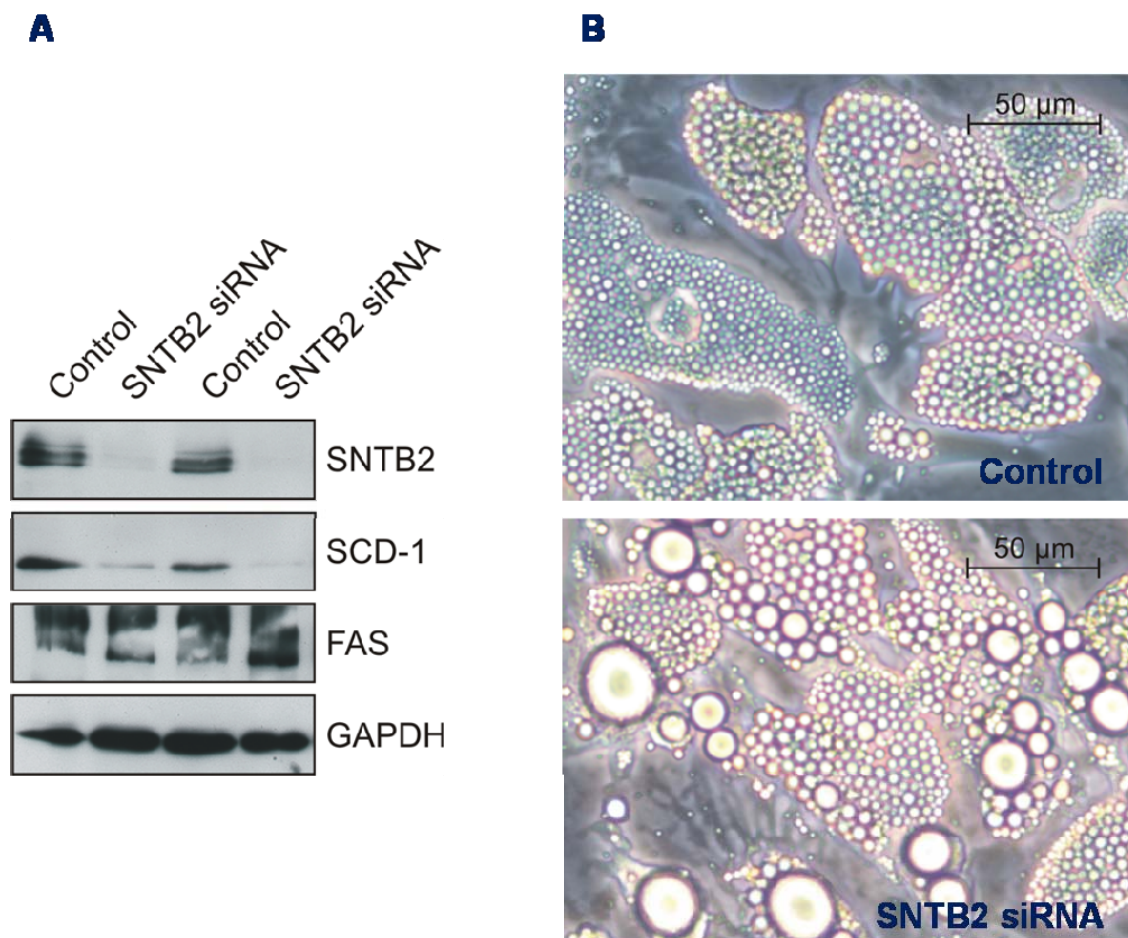


Abbildung 16: Knockdown in primären humanen Adipozyten mittels Transfektion als Präadipozyten und nachfolgender Differenzierung.

(A) Immunoblotanalyse von SNTB2, SCD-1 und FAS in Zellen mit Kontroll und SNTB2 siRNA.

(B) Lichtmikroskopische Aufnahmen der in A untersuchten Zellen.

Der Knockdown von SNTB2 führte des Weiteren in den humanen Adipozyten zu einer deutlichen Verminderung von SCD-1 während FAS nicht beeinflusst war.

### 3.4 Morphologie der Zellen – Ausbildung großer Lipidtröpfen

#### 3.4.1 FAS Knockdown

Sowohl in der Zelllinie 3T3-L1 als auch in primären humanen Adipozyten führte der Knockdown zur Ausbildung weniger großer Lipidtröpfen. In *Drosophila* wurde gezeigt, dass der Knockdown von FAS mit größeren Lipidtröpfen assoziiert ist [75]. Der Knockdown von FAS in Präadipozyten führte jedoch nicht zu größeren Fetttröpfen in den reifen 3T3-L1 Zellen. Vielmehr konnte man beobachten, dass die Zellen nur wenig Lipide

einlagerten. Die Triglyzeridkonzentration betrug 0,24 (0,20 – 0,30) mg/mg Zellprotein in Zellen mit Kontroll siRNA und 0,17 (0,09 – 0,19) mg/mg Zellprotein in Zellen mit FAS siRNA. Der Knockdown von FAS vermindert somit die Differenzierung zu Adipozyten. Adiponektin, welches von reifen Adipozyten freigesetzt wird [16] sank von 69,83(65,64 – 71,94) ng/ml auf 35,57 (34,82 – 36,94) ng/ml in den Überständen der Zellen mit FAS Knockdown ab.

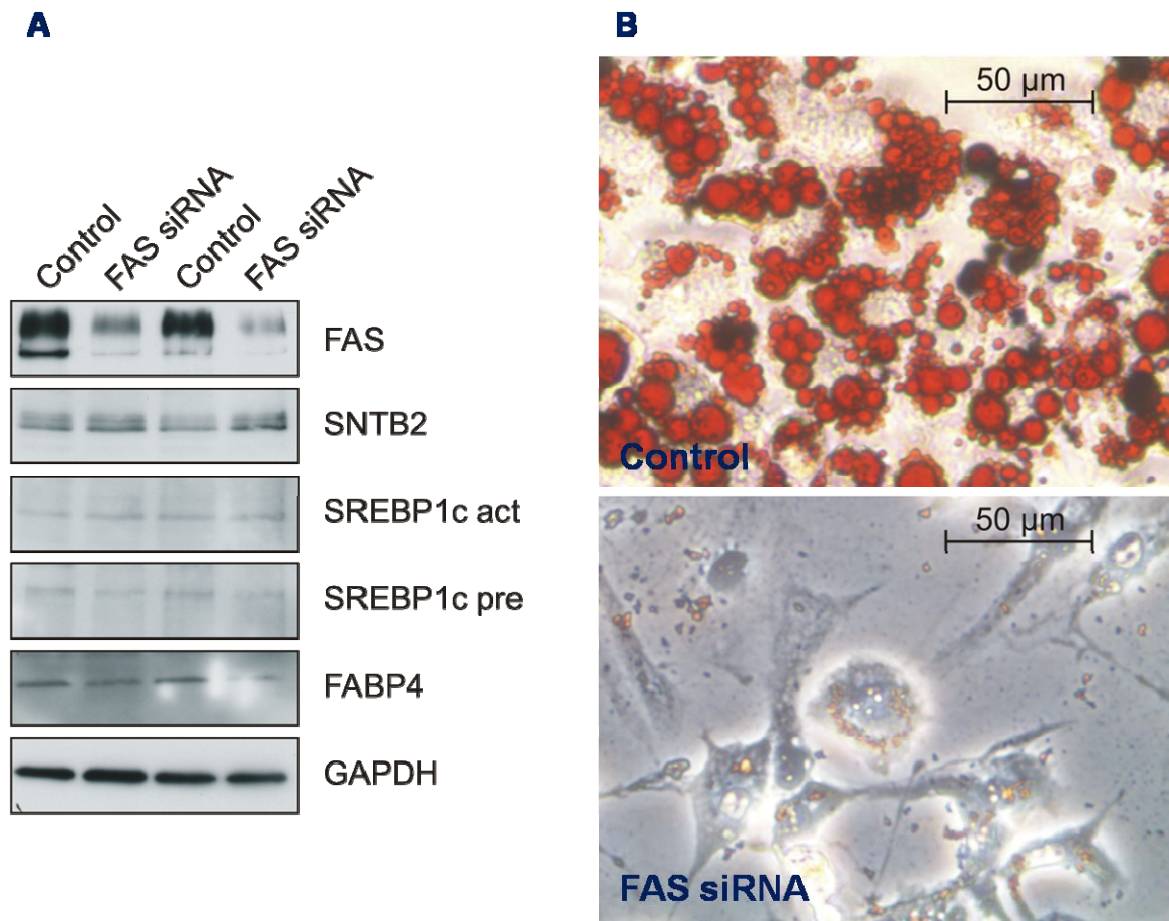


Abbildung 17: Analyse von Zellen mit FAS Knockdown.

(A) FAS, SNTB2, SREBP1c und FABP4 in 3T3-L1 Adipozyten mit Kontroll und FAS siRNA Transfektion. Als Ladungskontrolle diente die GAPDH.

(B) Oil Red O Färbung von Zellen mit Kontroll und FAS siRNA.

Abbildung 17 zeigt den erfolgreichen Knockdown von FAS (A) und der verminderten Adipogenese zu reifen Adipozyten (B). Die Proteinexpression von SNTB2 war nicht vom FAS Knockdown beeinflusst während SREBP1c und FABP4 vermindert vorlagen.



### 3.4.2 Cholesterindepletion

Neben der verminderten Genexpression von FAS führte auch die Veränderung von Enzymen der Cholesterinbiosynthese zu weniger aber größerer Lipidtropfen in *Drosophila* [75]. Somit kann eine Verminderung von zellulärem Cholesterin die Ausbildung großer Lipidtropfen bewirken. Wurden 3T3-L1 Zellen am Tag 6 nach der Induktion der Differenzierung mit Lovastatin, einem Inhibitor der HMG-CoA Reduktase, bis zum Ende der Adipogenese behandelt, so zeigten die reifen Adipozyten größere Lipidtropfen (Abbildung 18).

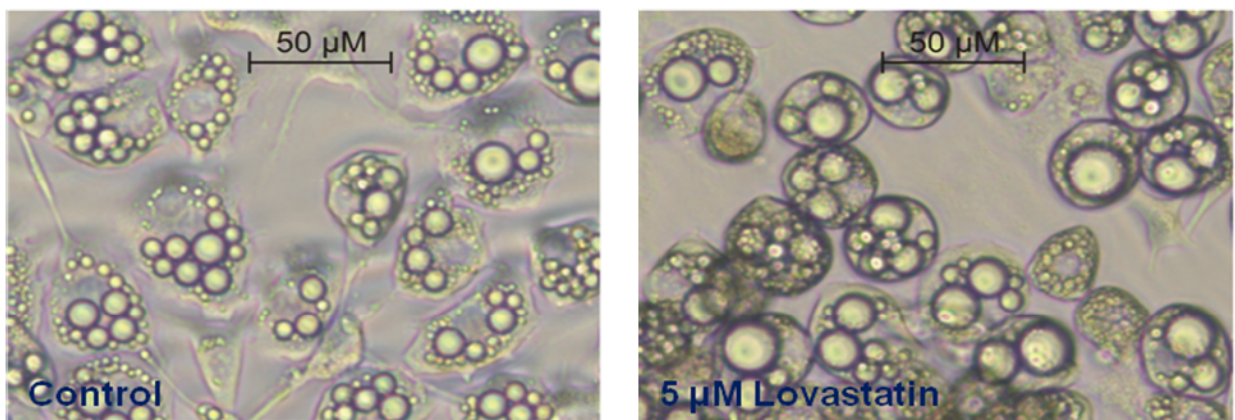


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3T3-L1 Adipozyten, welche die letzten 3 Tage der Differenzierung mit 5 µM Lovastatin behandelt wurden.

Der Gesamtcholesteringehalt war um etwa 20 % von 1,39 (1,13 – 1,48) mg/dl pro mg Zellprotein auf 1,12 (1,00 – 1,20) mg/dl pro mg Zellprotein reduziert, während die Menge an zellulären Triglyzeriden unverändert blieb. Der Transkriptionsfaktor SREBP2 wird bei reduzierten endogenen Cholesterinkonzentrationen über proteolytische Spaltung aktiviert [56, 59, 91]. Abbildung 19 A stellt die Aktivierung von SREBP2 dar, mit Spaltung und dadurch Verminderung der Vorläuferform und Induktion der aktiven Form. Des Weiteren wurde Chemerin induziert. Dies geschieht über eine direkte Interaktion des Chemerinpromotors mit SREBP2, welche wir mittels EMSA nachweisen konnten [56]. SNTB2 und Caveolin-1 wurden beide durch die Behandlung der Zellen mit Lovastatin reduziert.

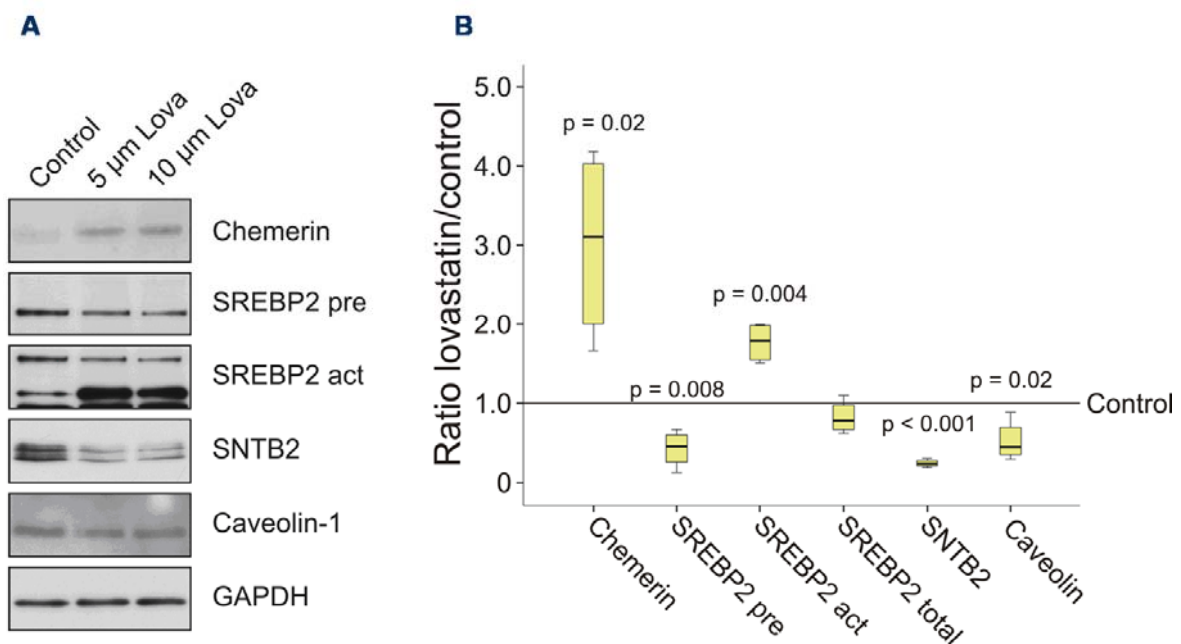


Abbildung 19: Lovastatin Behandlung von 3T3-L1 Zellen.

(A) Westernblotanalyse von Chemerin, SREBP2, SNTB2 und Caveolin-1 in Lovastatin behandelten Zellen.

(B) Quantifizierung von jeweils 4 Immunoblotexperimenten.

Der Einfluss der Lovastatin Behandlung wurde überdies auf mRNA-Ebene untersucht.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, führte die Inkubation mit Lovastatin, ähnlich wie auf Proteinebene, zu einer Erhöhung der Chemerin Expression, welche zur Induktion der HMG-CoA Reduktase führte. Des Weiteren zeigten sich eine verstärkte Expression von SREBP2, SNTB2 und eine reduzierte SREBP1c Expression.

	Kontrolle	5 µM Lova	p Value
Anzahl der Versuche	4	4	
Chemerin	1,18 (1,08 – 1,19)	1,66 (1,42 – 1,69)	p < 0,001
SREBP1c	0,79 (0,75 – 0,81)	0,60 (0,50 – 0,62)	p = 0,011
SREBP2	0,62 (0,62 – 0,69)	1,48 (1,14 – 1,69)	p = 0,014
HMG-CoA	0,45 (0,39 – 0,51)	1,62 (1,56 – 1,72)	p < 0,001
SNTB2	1,01 (0,99 – 1,03)	1,08 (1,03 – 1,09)	p = 0,015

Tabelle 1: mRNA-Expression von Chemerin, SREBP1c und 2, HMG-CoA und SNTB2. Die Expression der GAPDH diente zur Normalisierung.

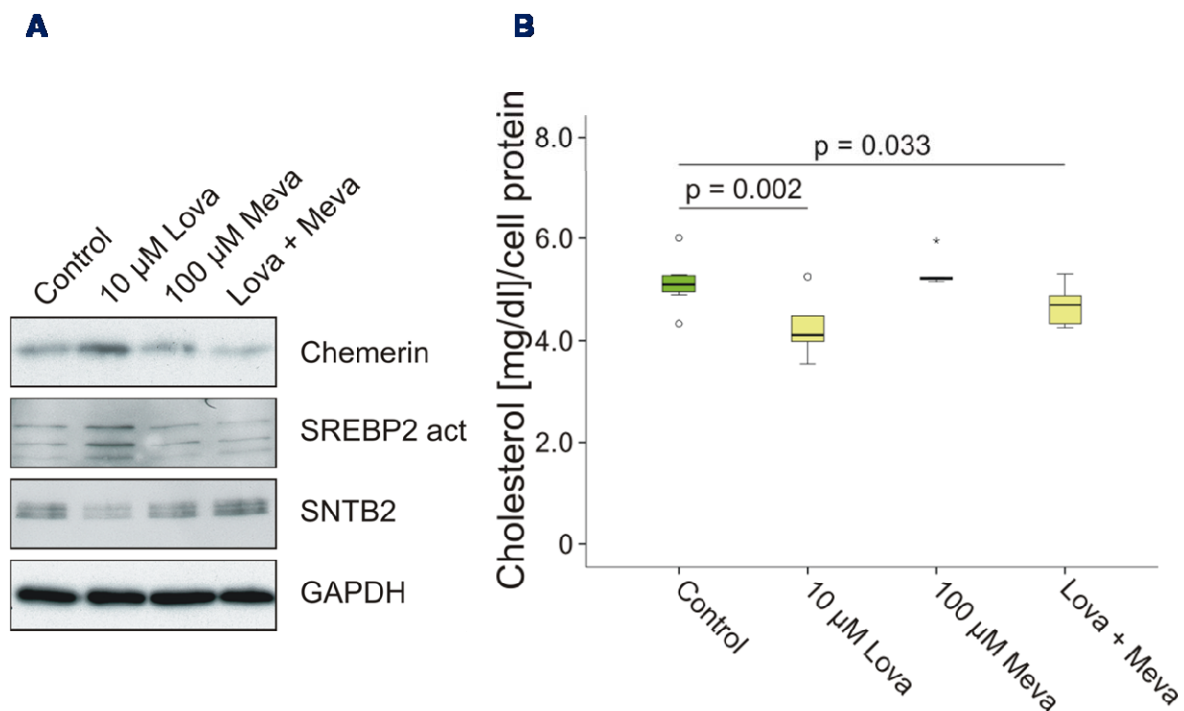


Abbildung 20: Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit Lovastatin und Mevalonat.

(A) Chemerin, SREBP2 und SNTB2 in Zellen mit Lovastatin, Mevalonat und beiden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Cholesterinkonzentration der Zellen aus A.

Sowohl Chemerin als auch die aktive SREBP2 Form wurden durch Behandlung mit 10  $\mu$ M Lovastatin induziert, während SNTB2 vermindert vorlag. Die Stimulation mit 100  $\mu$ M Mevalonat hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser Proteine, allerdings konnte eine gleichzeitige Inkubation von Lovastatin und Mevalonat die Effekte von Lovastatin aufheben (Abbildung 20 A). In Abbildung 20 B zeigt sich allerdings, dass die Reduktion der Gesamtcholesterinkonzentration nicht vollständig durch die Behandlung mit Mevalonat kompensiert werden konnte.

Des Weiteren konnte auch durch eine 24 h Inkubation von primären humanen Adipozyten mit 10  $\mu$ M Lovastatin die Ausbildung großer Lipidtropfen beobachtet werden (Abbildung 21).

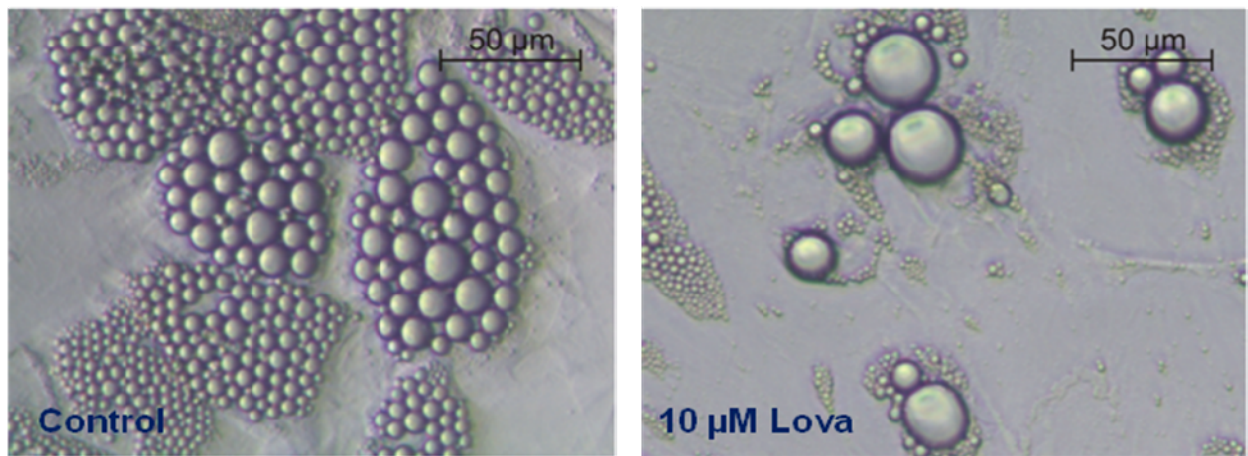


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären humanen Adipozyten, welche 24 h mit 10 µM Lovastatin stimuliert wurden.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass SNTB2 die Cholesterinhomöostase von Adipozyten beeinflusst.

### 3.4.3 SREBP2 Knockdown

Eine Cholesterindepletion hervorgerufen durch Behandlung mit Lovastatin induzierte die Aktivierung von SREBP2 und reduzierte SNTB2 auf Proteinebene. Der Knockdown von SREBP2 führt ebenfalls, nach Auswertung von jeweils 11 Kontroll- und SREBP2 siRNA-Experimenten, zur Verminderung der Gesamtcholesterinkonzentration von 4,62 (3,51–4,93) mg/dl pro mg Zellprotein auf 3,37 (2,58 – 4,39) mg/dl pro mg Zellprotein. Die gespeicherten zellulären Triglyzeride waren von 0,10 (0,05 – 0,17) mg/mg Zellprotein auf 0,04 (0,01 – 0,08) mg/mg Zellprotein gesunken. Der erfolgreiche Knockdown von SREBP2 ist in Abbildung 22 dargestellt, welcher mit einer Reduktion von Chemerin assoziiert war. SNTB2 wurde allerdings nicht durch die Transfektion mit SREBP2 siRNA und der damit einhergehenden Verminderung der gespeicherten zellulären Lipide beeinflusst.

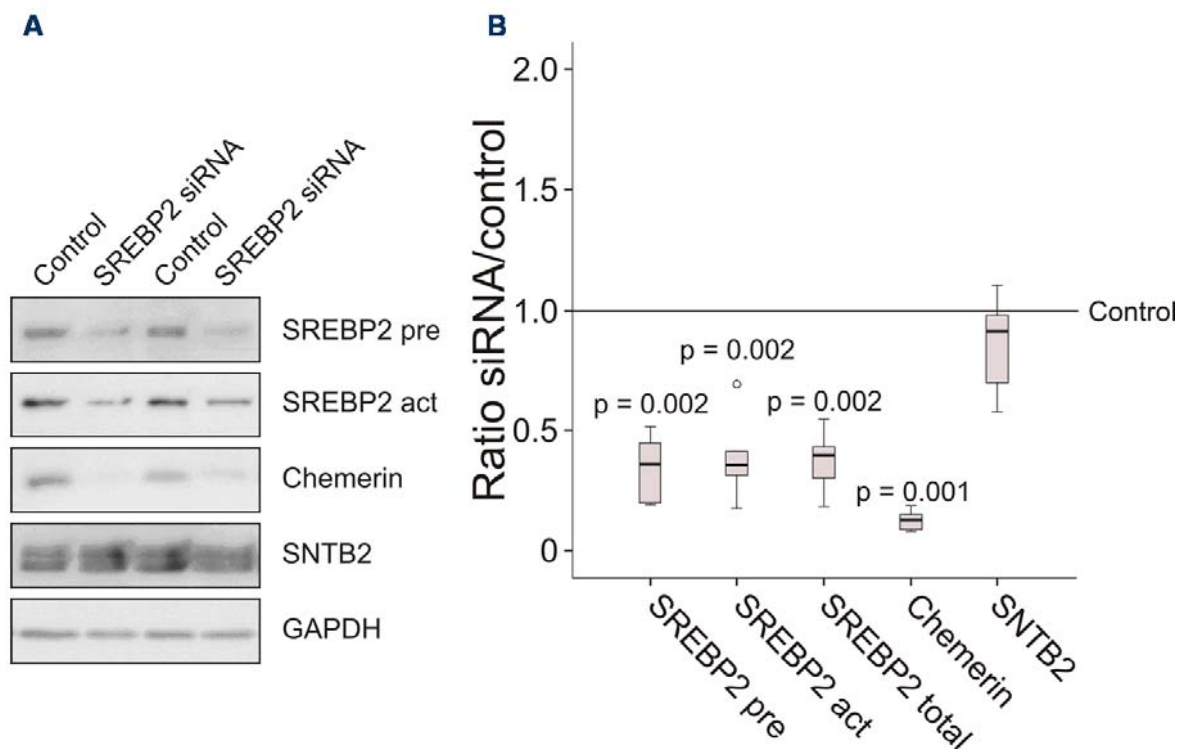


Abbildung 22: Proteinexpressionsanalyse (A) von SREBP2, Chemerin, CMKLR1, SNTB2 und SOD2 und Quantifizierung (B) von jeweils 6 siRNA Experimenten von Zellen transfiziert mit Kontroll und SREBP2 siRNA. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Eine Verminderung der Cholesterinmenge in den Zellen beeinflusst demnach nicht grundsätzlich die Expression von SNTB2.

### 3.5 Speicherung von freien Fettsäuren und Lipolyse

Der Knockdown von SNTB2 ging mit einer Verminderung der Adipogenese in 3T3-L1 Zellen einher. Die Menge gespeicherter Triglyzeride war in den SNTB2 siRNA transfizierten Zellen erniedrigt. Um zu untersuchen inwieweit die erniedrigten Triglyzeridkonzentrationen auf eine gestörte Speicherung von freien Fettsäuren in die Zelle oder eine Veränderung der Lipolyseaktivität zurück zu führen ist, wurden 3T3-L1 für 24 h mit Fettsäuren oder für 2 h mit Epinephrin inkubiert.

#### 3.5.1 Knockdown von SNTB2 während der Adipogenese

Wurden 3T3-L1 Zellen als Präadipozyten mit SNTB2 siRNA transfiziert, anschließend differenziert und als reife Adipozyten für 24 h mit 100  $\mu$ M Ölsäure (OA) und Linolsäure (LA) stimuliert, so nehmen die Zellen mehr Lipide auf und die Menge an gespeicherten Triglyzeriden in den Zellen nimmt zu (Abbildung 23 B). In Abbildung 23 A ist der Knockdown von SNTB2 und die Induktion von FABP4, welches für die Aufnahme und den



Transport von Lipiden in der Zelle benötigt wird, durch die Inkubation mit OA und LA gezeigt. Aus Abbildung 23 B geht zudem hervor, dass wie bereits beschrieben die Triglyzeridmenge in den SNTB2 siRNA behandelten Zellen erniedrigt war, die Zellen jedoch genau wie die Kontrollzellen zur Aufnahme und Speicherung von freien Fettsäuren befähigt waren.

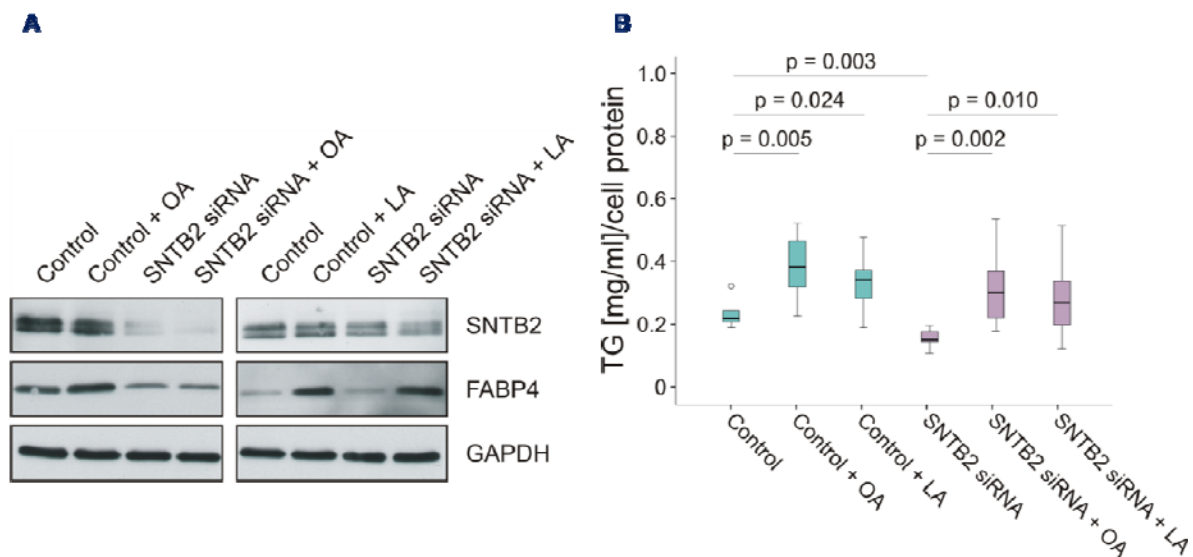


Abbildung 23: Analyse der Speicherung von Fettsäuren in 3T3-L1 Zellen, welche als Präadipozyten mit Kontroll oder SNTB2 siRNA transfiziert und nach anschließender Reifung für 24 h mit Ölsäure (OA) oder Linolsäure (LA) stimuliert wurden.

(A) Immunoblot von SNTB2 und FABP4. Die GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Triglyzeridkonzentrationen der Zelllysate aus A.

Eine gestörte Aufnahme von freien Fettsäuren ist somit nicht der Grund für die geringeren Mengen an gespeicherten Triglyzeriden. Folglich wurde die Lipolyseaktivität in den Zellen gemessen. Abbildung 24 A zeigt den Knockdown von SNTB2 und die induzierte Phosphorylierung der HSL bei Stimulation mit Epinephrin auf Proteinebene. FAS wurde nicht durch die Epinephrin Behandlung verändert. In den Überständen der Zellen wurde der Gehalt an freiem Glycerin gemessen, welcher Rückschlüsse auf die Lipolyserate ziehen lässt. Dabei wurden zum einen die basale und die induzierte Lipolyse untersucht.

Die Inkubation mit Epinephrin hatte eine Zunahme der Freisetzung von Glycerin sowohl in den Kontroll als auch in den SNTB2 siRNA transfizierten Zellen zur Folge (Abbildung 24 B).

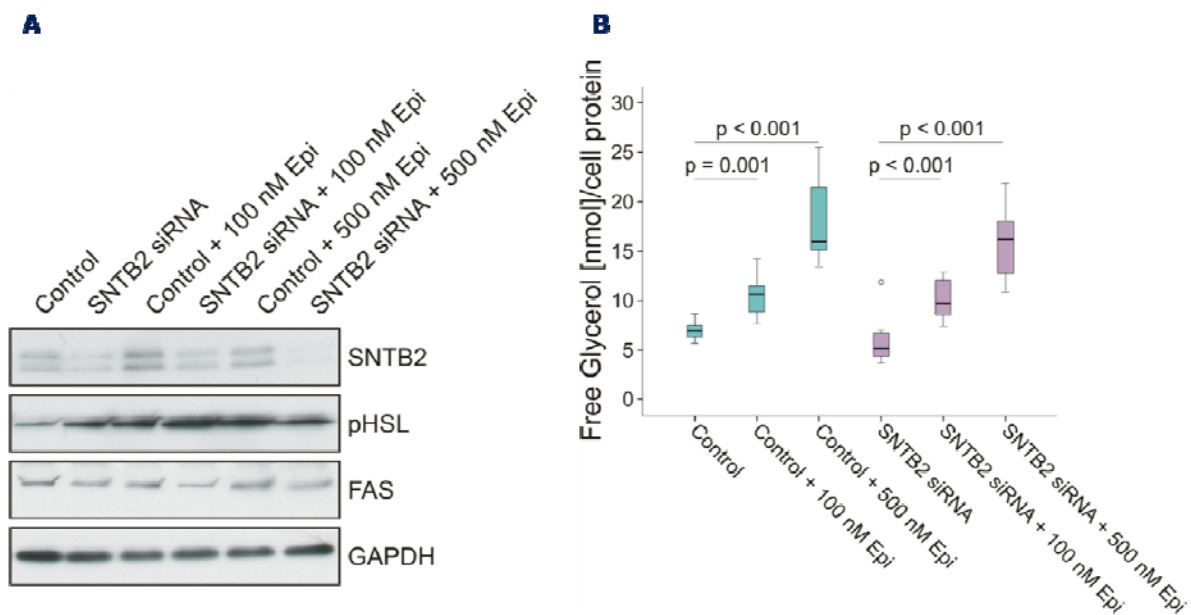


Abbildung 24: Analyse der Lipolyserate von 3T3-L1 Zellen, welche als Präadipozyten mit Kontroll oder SNTB2 siRNA transfiziert und nach anschließender Reifung für 2 h mit 100 nM oder 500 nM Epinephrin stimuliert wurden.

(A) Immunoblot von SNTB2, pHSL und FAS. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Konzentrationen des freien Glycerins in den Zellüberständen

Analysiert man allerdings das Verhältnis von induzierter zu basaler Lipolyse, so war die induzierte Lipolyse in den Zellen mit SNTB2 Knockdown im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht (Tabelle 2).

	Kontrolle 100 nM Epi/basal	Kontrolle 500 nM Epi/basal	SNTB2 siRNA 100 nM Epi/basal	SNTB2 siRNA 500 nM Epi/basal	p Value
Anzahl der Versuche	10	12	11	12	
Induktion der Lipolyse	1,54 <sup>(1)</sup> (1,11 – 2,06)	2,31 <sup>(2)</sup> (1,94 – 3,69)	1,92 <sup>(1)</sup> (1,47 – 2,56)	3,23 <sup>(2)</sup> (2,17 – 4,37)	p = 0.003 <sup>(1)</sup> p = 0.011 <sup>(2)</sup>

Tabelle 2: Verhältnis der induzierten zur basalen Lipolyserate in Kontroll und SNTB2 siRNA behandelten Zellen.

Diese erhöhte induzierte Lipolyserate könnte die geringeren Mengen an Triglyzeriden zum Teil erklären.

### 3.5.2 Knockdown von SNTB2 in reifen Zellen

Die bisherigen RNA Interferenz Versuche erfolgten in Präadipozyten, welche zu reifen Adipozyten differenziert wurden und zeigen, dass der SNTB2 Knockdown die Adipozyten Differenzierung beeinflusst. Um diese Effekte von den direkten Auswirkungen des SNTB2 Knockdowns auf die Adipozyten unterscheiden zu können, wurden auch reife Adipozyten mit SNTB2 siRNA behandelt und untersucht. Der erfolgreiche Knockdown von SNTB2 in den reifen Adipozyten ist ebenso wie die Zunahme von FABP4 durch OA und LA Inkubation in Abbildung 25 A dargestellt. Die Aufnahme von freien Fettsäuren wurde, wie bei den als Präadipozyten transfizierten Zellen, nicht durch den Knockdown beeinflusst (Abbildung 25 B). Allerdings wurden in den SNTB2 siRNA behandelten Zellen nicht mehr wie zuvor weniger gespeicherte Triglyzeride gemessen. Der Knockdown in reifen Adipozyten hatte keinen Einfluss mehr auf die Menge an zellulären Triglyzeriden.

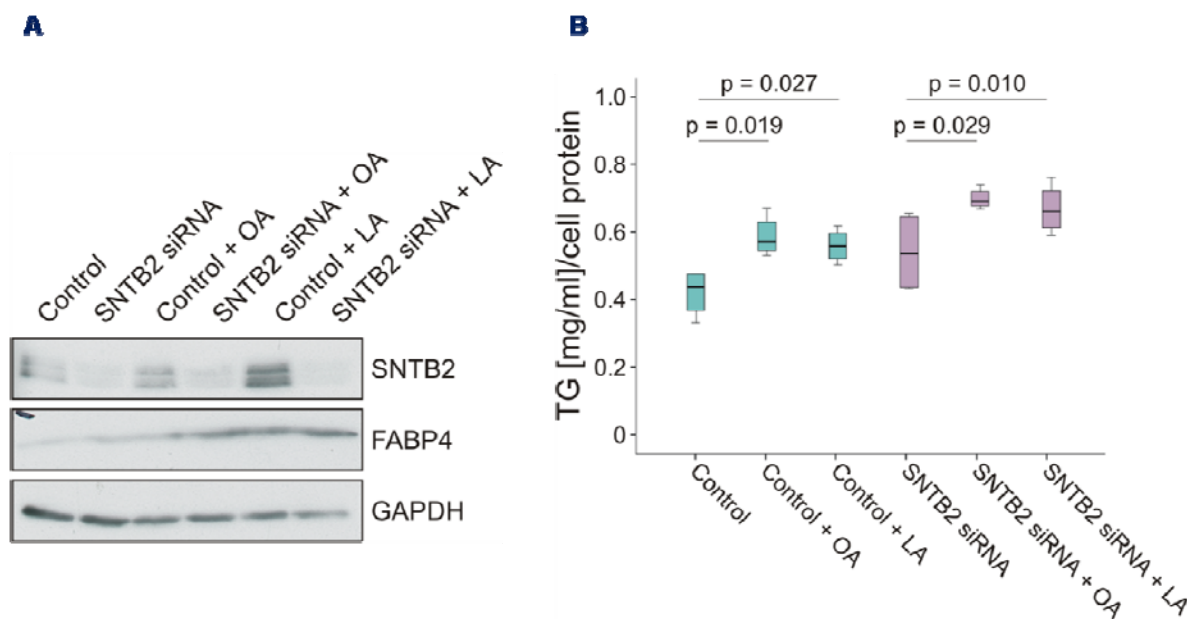


Abbildung 25: Analyse der Speicherung von Triglyzeriden in 3T3-L1 Zellen, welche als reife Adipozyten mit Kontroll oder SNTB2 siRNA transfiziert und für 24 h mit Ölsäure (OA) oder Linolsäure (LA) stimuliert wurden.

(A) Immunoblot von SNTB2 und FABP4. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Triglyzeridkonzentrationen der Zelllysate aus A.

Des Weiteren wurde die Lipolyse in den reifen Adipozyten untersucht. Mit SNTB2 siRNA behandelte reife Adipozyten wurden für 2 h mit Epinephrin stimuliert. FAS wurde wie zuvor nicht durch die Epinephrin Behandlung beeinflusst, während ATGL durch Epinephrin induziert wurde (Abbildung 26 A). In Abbildung 26 B ist zudem dargestellt, wie



die Inkubation mit Epinephrin die Lipolyse aktiviert und so die Freisetzung von Glycerin induziert.

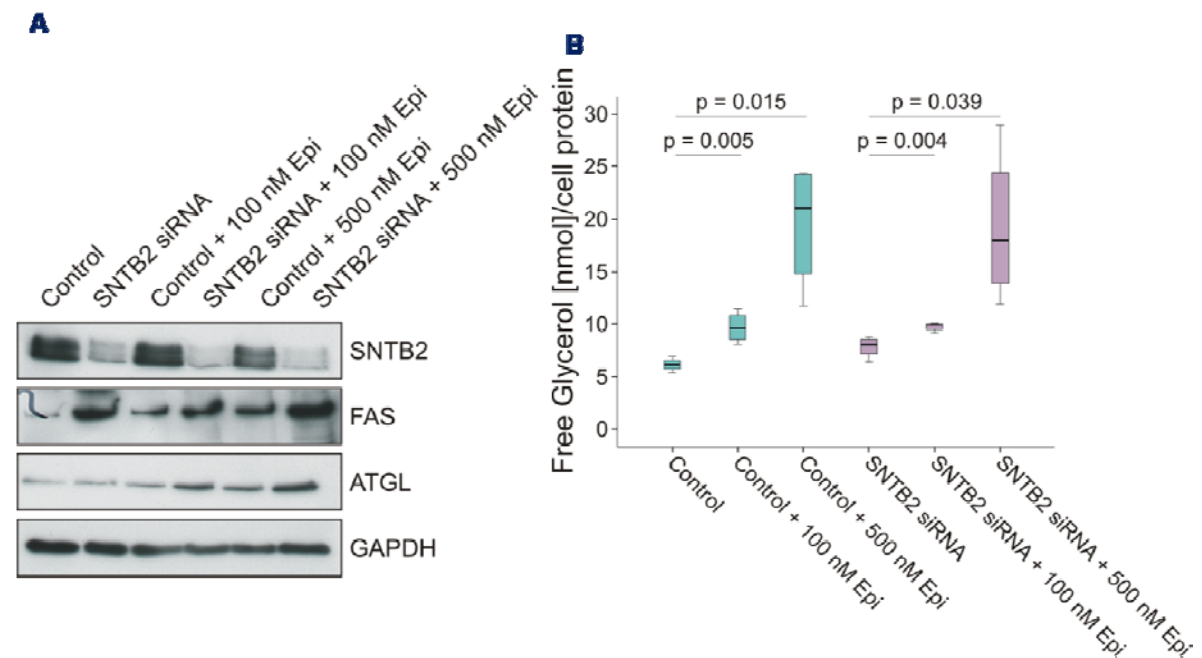


Abbildung 26: Analyse der Lipolyserate von 3T3-L1 Zellen, welche als reife Adipozyten mit Kontroll oder SNTB2 siRNA transfiziert und für 2 h mit 100 nM oder 500 nM Epinephrin stimuliert wurden.

(A) Immunoblot von SNTB2, FAS und ATGL. Die GAPDH diene als Ladungskontrolle.

(B) Konzentrationen des freien Glycerins in Zellüberständen von den in A beschriebenen Zellen.

Untersucht man die Induktion der Lipolyse, so war hier das Verhältnis induzierter zu basaler Lipolyse in den SNTB2 Knockdown Zellen im Vergleich zu den Kontrollen vermindert (Tabelle 3).

	Kontrolle 100 nM Epi/basal	Kontrolle 500 nM Epi/basal	SNTB2 siRNA 100 nM Epi/basal	SNTB2 siRNA 500 nM Epi/basal	p Value
Anzahl der Versuch	4	4	4	4	
Induktion der Lipolyse	1,56 <sup>(1)</sup> (1,31 – 1,86)	3,42 <sup>(2)</sup> (1,91 – 3,96)	1,23 <sup>(1)</sup> (1,13 – 1,24)	2,21 <sup>(2)</sup> (1,47 – 3,57)	p = 0.018 <sup>(1)</sup> p = 0.025 <sup>(2)</sup>

Tabelle 3: Verhältnis der induzierten zur basalen Lipolyserate in Kontroll und SNTB2 siRNA behandelten Zellen.

### 3.6 Identifizierung von Interaktionspartnern

Aufgrund seines modularen Aufbaus kann SNTB2 mit einer Reihe von Proteinen interagieren. Die Assoziation von SNTB2 mit Utrophin ist bereits bekannt [76] und konnte von uns ebenfalls in 3T3-L1 Zellen mittels Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Abbildung 27 zeigt, dass Utrophin nur in SNTB2 Immunpräzipitaten zu detektieren war (Lane 1 und 3). Des Weiteren konnte Caveolin-1 als Interaktionspartner identifiziert werden (Lane 3). In Präadipozyten konnte allerdings keine Interaktion von SNTB2 mit Caveolin-1 festgesellt werden, da in Präadipozyten Caveolin-1 vermutlich zu gering exprimiert war (Lane 1). Zur Verifizierung der Bindung von SNTB2 an Caveolin-1 wurden auch Koimmunpräzipitationen mit dem Caveolin-1 Antikörper durchgeführt. Es bestätigte sich die Bindung, da SNTB2 in den Caveolin-1 Präzipitaten nachweisbar war (Lane 2 und 4).

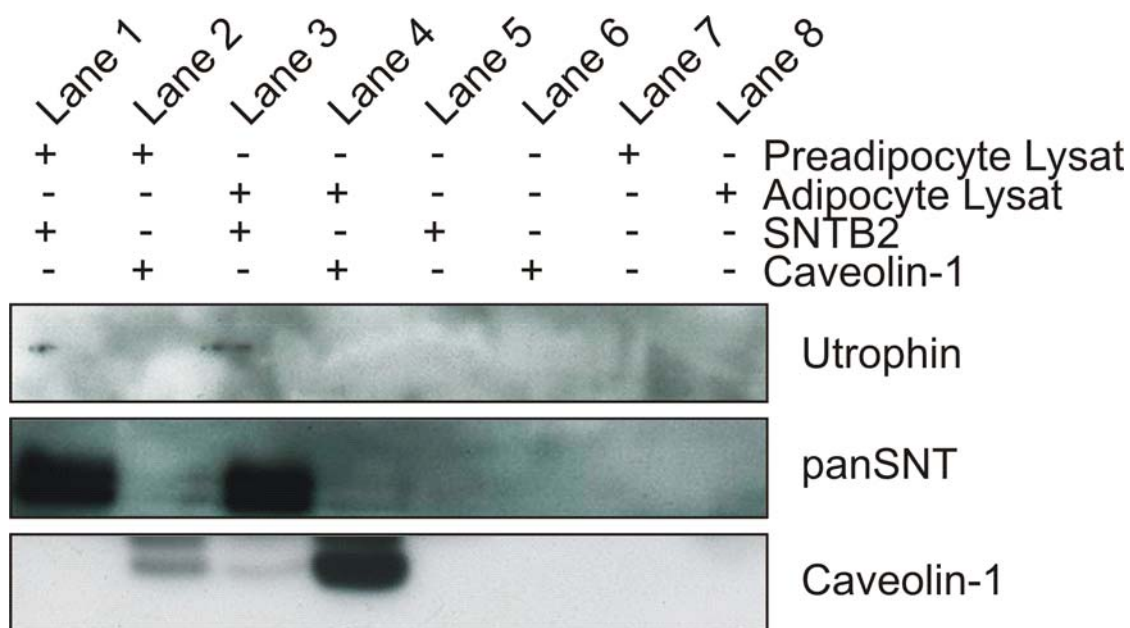


Abbildung 27: Westernblot der Immunpräzipitation mit SNTB2 und Caveolin-1 Antikörper in 3T3-L1 Präadipozyten und reifen Adipozyten. Utrophin, panSNT und Caveolin-1 wurden analysiert. Lane 1, Präadipozytenlysate mit SNTB2 Antikörper (AB); Lane 2, Präadipozytenlysate mit Caveolin-1 Antikörper; Lane 3, Adipozytenlysate mit SNTB2 Antikörper; Lane 4, Adipozytenlysate mit Caveolin-1 Antikörper; Lane 5 und 6, Negativkontrollen ohne Lysat; Lane 7 und 8, Negativkontrollen ohne Antikörper.

#### 3.6.1 Utrophin Knockdown

Aus verschiedenen Publikationen ist bereits bekannt, dass SNTB2 mit Utrophin Komplexe bilden kann. Um den Einfluss von Utrophin auf die SNTB2 Expression in Adipozyten zu untersuchen wurden RNA-Interferenz Experimente mit Utrophin siRNA in den 3T3-L1 Zellen durchgeführt. Die 3T3-L1 Präadipozyten wurden mit Utrophin siRNA transfiziert

und anschließend differenziert. Der Utrophin Knockdown führte zu einer sehr starken Reduktion von SNTB2 (Abbildung 28 A), während die SNTB2 siRNA keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Utrophin zeigte (Abbildung 28 A).  $\beta$ Actin stellt neben SNTB2 einen weiteren Interaktionspartner von Utrophin dar. Die Transfektion der Zellen mit Utrophin siRNA reduzierte ebenfalls die Proteinmenge an  $\beta$ Actin, während ABCA1 als weiteres SNTB2 interagierendes Protein und SREBP2 nicht beeinflusst wurden (Abbildung 28).

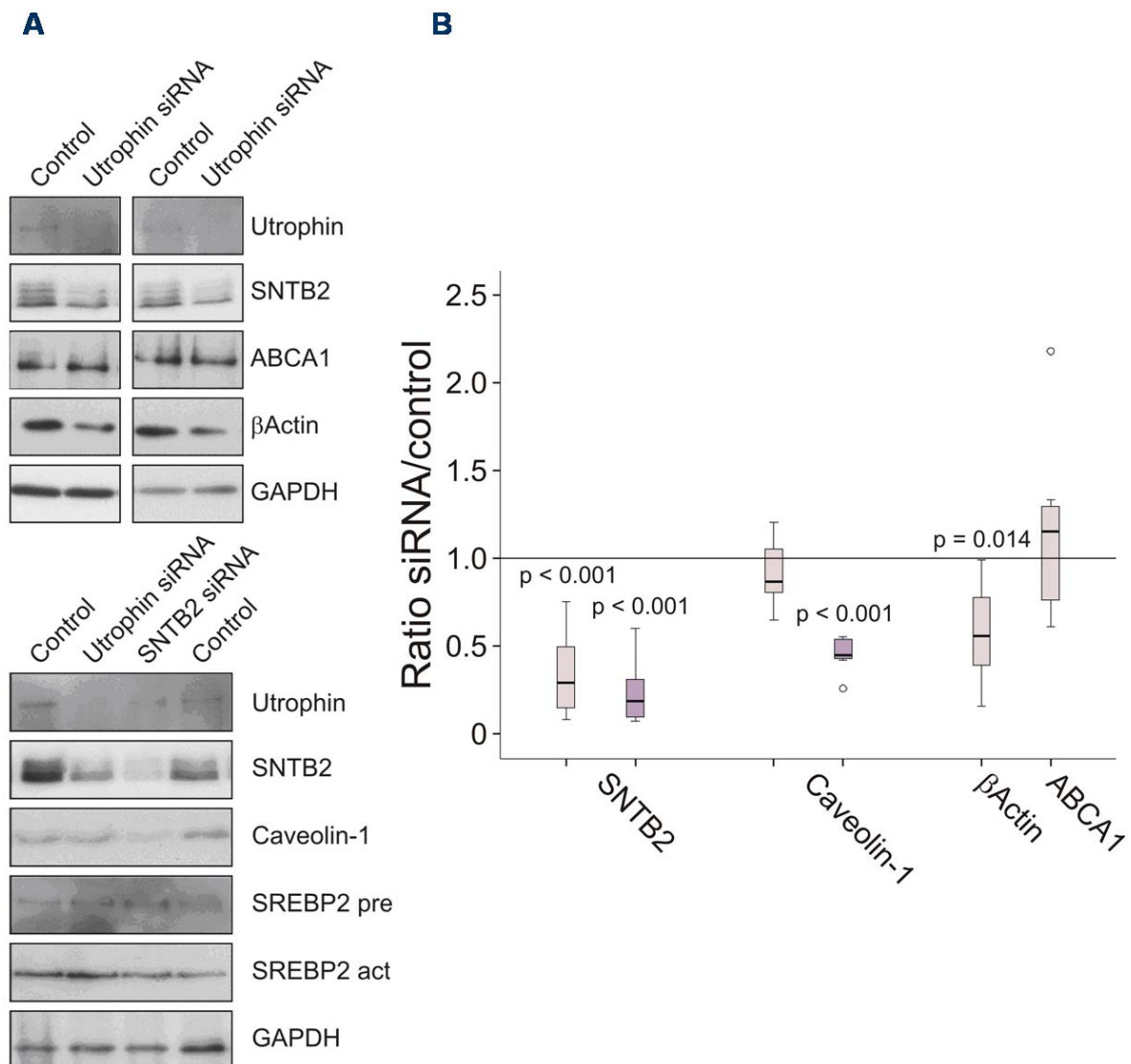


Abbildung 28: Analyse von Zellen differenziert aus Präadipozyten mit einem Utrophin Knockdown.

(A) Immunoblotanalyse von Utrophin, SNTB2, ABCA1,  $\beta$ Actin, Caveolin-1 und SREBP2 in Zellen behandelt mit Kontroll, Utrophin und SNTB2 siRNA. Die GAPDH diene als Beladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von SNTB2, Caveolin-1,  $\beta$ Actin und ABCA1 in 3T3-L1 Adipozyten transfiziert mit Utrophin siRNA (helles lila) und SNTB2 siRNA (dunkles lila). Die GAPDH diene zur Normalisierung. Es wurden jeweils 4 bis 20 siRNA Experimente ausgewertet.

Auch Caveolin-1 lag nur reduziert in den Zellen mit SNTB2 siRNA vor, während der Knockdown von Utrophin darauf keinen Einfluss hatte.

Ähnlich dem SNTB2 Knockdown bildeten Adipozyten mit Utrophin Knockdown größere Lipidtopfen aus (Abbildung 29) und speicherten weniger Triglyzeride im Zellinneren (Tabelle 4). Auf den Gesamtcholesteringehalt scheint die Utrophin siRNA allerdings keinen Einfluss zu haben, da hier kein Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erkennen war, während der SNTB2 Knockdown zu einer reduzierten Cholesterinmenge führte.

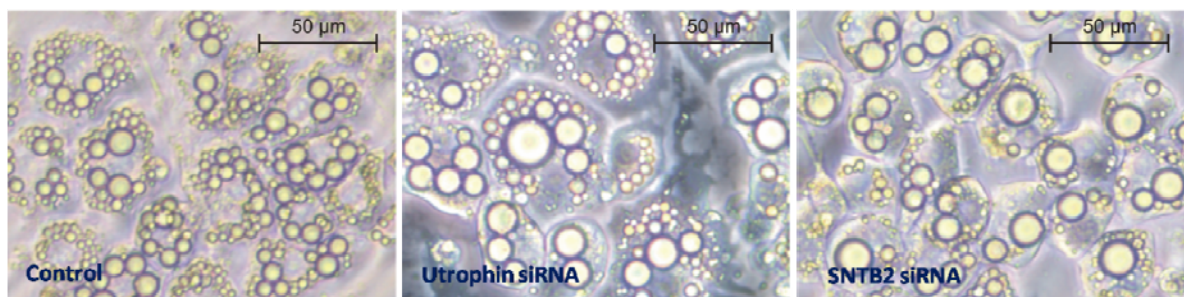


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3T3-L1 Adipozyten, welche mit Kontroll-, Utrophin- und SNTB2 siRNA als Präadipozyten transfiziert und anschließend zu reifen Adipozyten differenziert wurden.

	Kontrolle	Utrophin siRNA	SNTB2 siRNA	p Value
Anzahl der Versuche	7	7	4	
TG [mg/ml]	0,21 <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> (0,19 – 0,29)	0,14 <sup>(1)</sup> (0,09 – 0,16)	0,017 <sup>(2)</sup> (0,14 – 0,19)	p = 0.002 <sup>(1)</sup> p = 0.004 <sup>(2)</sup>
Anzahl der Versuche	7	8	5	
Cholesterin [mg/dl]	6,69 <sup>(1)</sup> (6,22 – 7,75)	6,81 (6,67 – 7,40)	6,29 <sup>(1)</sup> (5,83 – 6,70)	p = 0.039 <sup>(1)</sup>

Tabelle 4: Konzentrationen von Triglyzeriden (TG) und Cholesterin pro Zellprotein in Zellen mit Utrophin und SNTB2 Knockdown.

### 3.6.2 Caveolin-1 Knockdown

In den Koimmunpräzipitationsexperimenten wurde Caveolin-1 als Interaktionspartner von SNTB2 identifiziert. Der Einfluss von Caveolin-1 auf die Expression von SNTB2 wurde mittels Caveolin-1 Knockdown untersucht. In Abbildung 30 ist der Knockdown von Caveolin-1 unter Verwendung von 2 verschiedenen siRNAs als auch dem Pool der beiden, deutlich zu erkennen. SNTB2 lag in den Zellen mit Caveolin-1 Knockdown erhöht vor.

FAS, HSL, und  $\beta$ Actin wurden nicht durch die verschiedenen siRNAs beeinflusst. Lediglich ATGL wurde durch den Caveolin-1 Knockdown verringert.

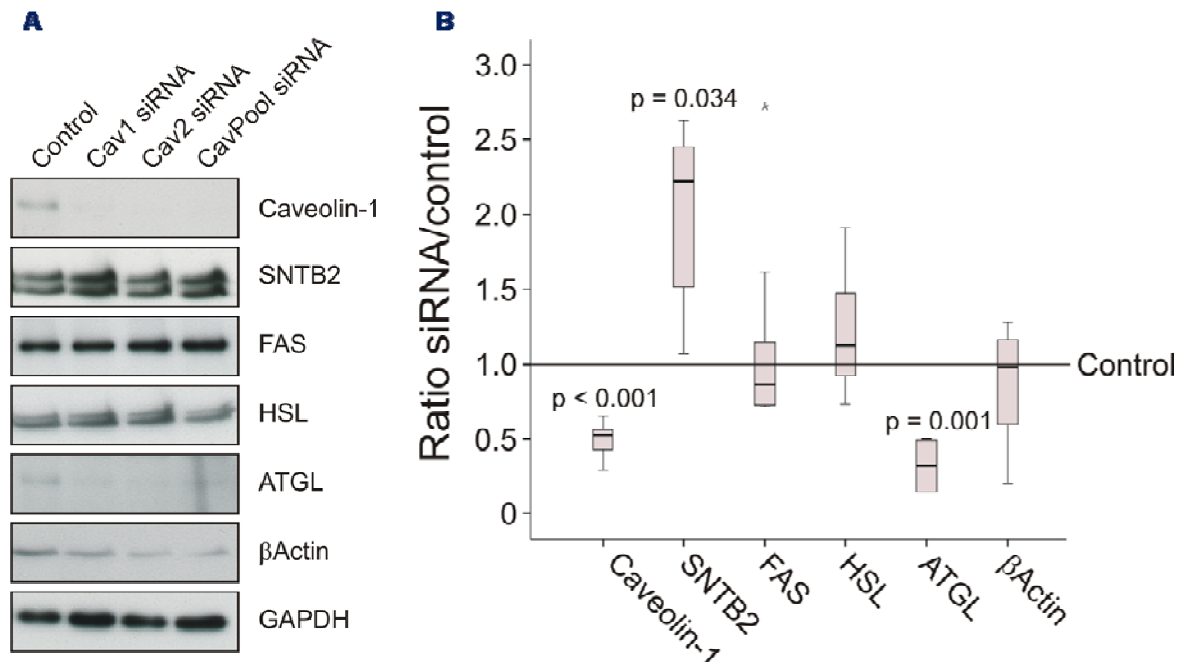


Abbildung 30: Untersuchungen des Caveolin-1 Knockdowns in Zellen transfiziert mit 2 verschiedenen Caveolin-1 siRNAs und dem Pool der siRNAs.

(A) Westernblotanalyse von Caveolin-1, SNTB2, FAS, HSL, ATGL, und  $\beta$ Actin. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

(B) Quantifizierung der Immunoblots aus A von jeweils 3 siRNA Versuchen.

Die Konzentration der intrazellulären Triglyzeride und Cholesterin war in den Zellen mit Caveolin-1 Knockdown vermindert.

	Kontrolle	Caveolin-1 siRNA	p Value
Anzahl der Versuche	11	15	
TG [mg/ml]	1,39 (1,23 – 1,56)	1,19 (1,03 – 1,32)	$p < 0.001$
Anzahl der Versuche	11	14	
Cholesterin [mg/dl]	6,85 (6,43 – 7,45)	6,45 (5,05 – 7,47)	$p = 0.014$

Tabelle 5: Konzentrationen von Triglyzeriden (TG) und Cholesterin pro Zellprotein in Zellen mit Caveolin-1 Knockdown und Kontrollzellen.

Während der Caveolin-1 Knockdown die Proteinexpression von SNTB2 induzierte, wurde im Gegensatz dazu Caveolin-1 in Zellen mit SNTB2 siRNA reprimiert (Abbildung 31).



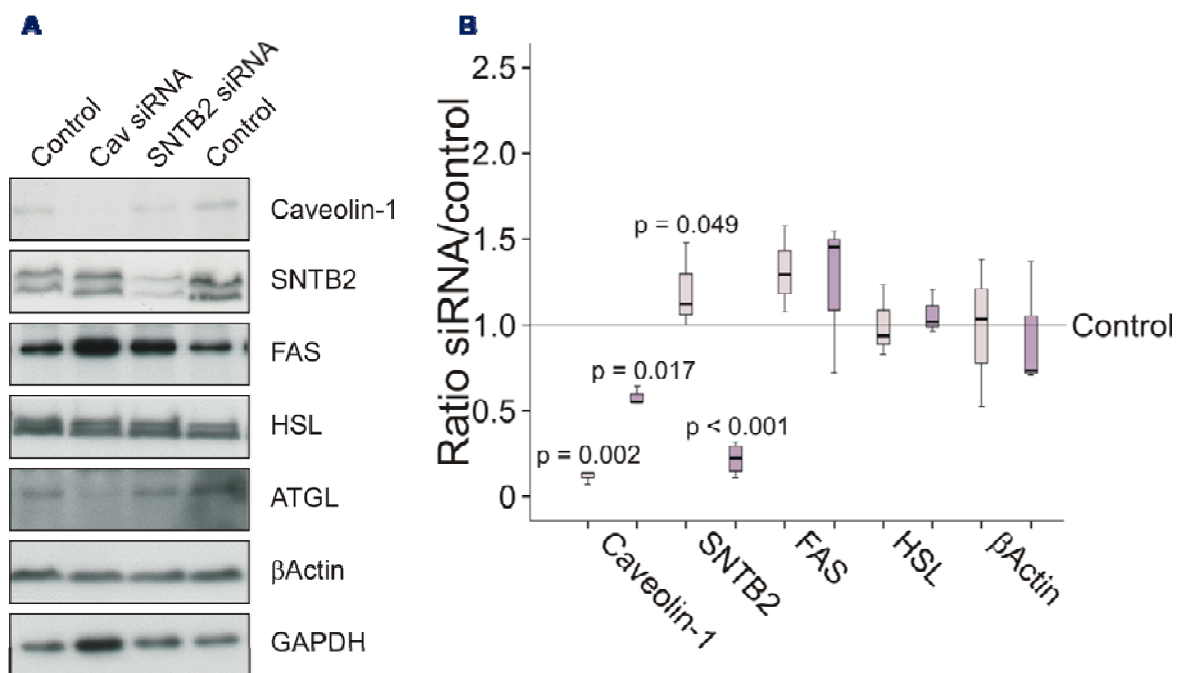


Abbildung 31: Analyse von Zellen mit Caveolin-1 und SNTB2 Knockdown.

(A) Immunoblotanalyse von Caveolin-1, SNTB2, FAS, ATGL, und  $\beta$ Actin in Zellen behandelt mit Kontroll und Caveolin-1 siRNA. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von jeweils 3 bis 4 siRNA Experimenten von Caveolin-1, SNTB2, FAS, HSL und  $\beta$ Actin in 3T3-L1 Adipozyten transfiziert mit Caveolin-1 siRNA (helles lila) und SNTB2 siRNA (dunkleres lila). Die GAPDH diente zur Normalisierung.

Die Proteine FAS, HSL und  $\beta$ Actin wurden durch den Caveolin-1 Knockdown nicht beeinträchtigt. Phänotypisch bildeten die Zellen mit Caveolin-1 siRNA größere Lipidtropfen aus (Abbildung 32).

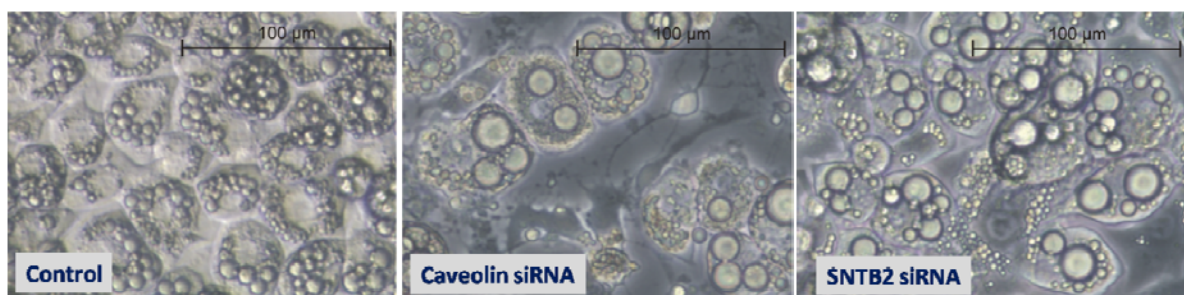


Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3T3-L1 Adipozyten, welche mit Kontroll, Caveolin-1 und SNTB2 siRNA als Präadipozyten transfiziert und anschließend zu reifen Adipozyten differenziert wurden.

### 3.7 Metabolische Charakterisierung der SNTB2 defizienten Mäuse

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von SNTB2 in vivo wurden uns von Prof. Dr. Marvin E. Adams Mäuse mit SNTB2 Defizienz zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse zeigten keinen Phänotyp und bildeten normale neuromuskuläre Verbindungen aus. Die Auswirkungen der SNTB2 Defizienz auf den Metabolismus der Tiere wurden bisher noch nicht detailliert untersucht und stellten somit einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

#### 3.7.1 Gewicht und Serumparameter

Wildtyp C57BL/6 und SNTB2 defizienten Mäuse wurden für 24 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert, um eine Diät induzierte Fettleibigkeit zu erzielen. Die Gewichtszunahme der Tiere wurde dokumentiert und am Versuchsende wurden die Körpergewichte und die Gewichte der Fettdepots, der Leber und der Milz festgehalten. In Tabelle 6 ist die Gewichtszunahme der Tiere als Fläche unter der Kurve (AUC) und die weiteren Gewichte der Organe dargestellt. Sowohl die Wildtyp als auch die SNTB2 -/- Mäuse nahmen in gleicher Weise während der Diät beträchtlich zu, das Körpergewicht und das Gewicht der Lebern waren am Ende der Hochfettdiät vergleichbar. Die Fettdepots der SNTB2 Knockout Mäuse waren allerdings deutlich kleiner, während das Gewicht der Milzen erhöht war.

	<b>C57BL/6</b>	<b>SNTB2 -/-</b>	<b>p Value</b>
Anzahl der Tiere	8	7	
Körpergewicht AUC	812,32 (754,05 – 1019,94)	725,68 (689,67 – 950,92)	
Körpergewicht nach 24 Wochen HFD [g]	38,79 (35,55 – 46,96)	33,69 (29,69 – 47,71)	
WAT sc/ Körpergewicht [g]	0,04 (0,03 – 0,05)	0,01 (0,01 – 0,04)	p = 0.027
WAT epi/ Körpergewicht [g]	0,06 (0,05 – 0,06)	0,03 (0,02 – 0,06)	p = 0.035
WAT ren/ Körpergewicht [g]	0,025 (0,02 – 0,03)	0,016 (0,01 – 0,04)	p = 0.037
Leber/ Körpergewicht [g]	0,04 (0,03 – 0,06)	0,04 (0,03 – 0,05)	
Milz/ Körpergewicht [g]	0,08 (0,07 – 0,12)	0,12 (0,12 – 0,47)	p = 0.004

Tabelle 6: Analyse der Gewichtszunahme nach 24 Wochen Hochfettdiät dargestellt als Fläche unter der Kurve (AUC), des Körpergewichts der Mäuse am Versuchsende und des Gewichts der verschiedenen Fettdepots (WAT: white adipose tissue, sc subkutan, epi epididymal, ren perirenal), der Leber und der Milz pro Körpergewicht.

Im über Nacht gefasteten Zustand wurden die Wildtyp und SNTB2  $-/-$  Mäuse mit 1 mU Insulin/g Körpergewicht bzw. mit H<sub>2</sub>O intraperitoneal gespritzt und das Serum der Mäuse nach 10 min analysiert.

Gefastete Serum-spiegel	C57BL/6	C57BL/6 + Insulin	SNTB2 $-/-$	SNTB2 $-/-$ + Insulin	p Value
Anzahl der Tiere	4	4	3	4	
TG [mg/ml]	0,55 (0,45 – 0,69)	0,57 (0,55 – 0,60)	0,50 (0,42 – 0,56)	0,54 (0,46 – 0,58)	
Cholesterin [mg/dl]	114,97 <sup>(1)</sup> (103,3 – 120,7)	104,22 (100,1 – 110,7)	81,39 <sup>(1)</sup> (51,50 – 93,04)	63,68 (54,83 – 92,96)	p = 0.001 <sup>(1)</sup>
FFA [mM]	0,09 (0,07 – 0,11)	0,07 (0,06 – 0,08)	0,09 <sup>(1)</sup> (0,08 – 0,11)	0,05 <sup>(1)</sup> (0,04 – 0,07)	p = 0.034 <sup>(1)</sup>
Freies Glycerin [nmol]	14,67 (10,91 – 17,01)	13,25 <sup>(2)</sup> (10,05 – 14,82)	12,81 <sup>(1)</sup> (9,99 – 14,81)	5,83 <sup>(1)(2)</sup> (4,16 – 7,32)	p = 0.034 <sup>(1)</sup> p = 0.021 <sup>(2)</sup>
Glukagon [ng/ml]	111,45 (90,9 – 168,5)	140,71 (103,9 – 179,2)	116,94 (101,4 – 129,0)	137,04 (120,6 – 188,7)	
Insulin [µg/l]	0,67 <sup>(1)</sup> (0,33 – 1,93)	5,73 <sup>(1)</sup> (2,32 – 8,69)	0,01 <sup>(2)</sup> (0,00 – 1,06)	7,88 <sup>(2)</sup> (5,95 – 9,04)	p = 0.021 <sup>(1)</sup> p = 0.032 <sup>(2)</sup>
Glukose [mg/dl]	353,85 <sup>(1)</sup> (311,2 – 424,2)	334,00 (311,2 – 425,4)	225,90 <sup>(1)</sup> (206,7 – 306,4)	202,45 (176,6 – 287,2)	p < 0.001 <sup>(1)</sup>
Adiponektin [µg/ml]	7,33 (6,16 – 9,14)	7,17 (6,08 – 7,41)	6,02 (4,42 – 10,26)	6,26 (4,73 – 9,81)	
Chemerin [µg/ml]	0,23 (0,20 – 0,37)	0,19 (0,16 – 0,25)	0,39 (0,22 – 0,42)	0,19 (0,17 – 0,28)	

Tabelle 7: Darstellung der Serumparameter der gefasteten Mäuse nach Insulininjektion bzw. H<sub>2</sub>O-Injektion. (TG: Triglyzeride, FFA: freie Fettsäuren)

Die Konzentration der Triglyzeride im Serum war in Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäusen vergleichbar. Die Menge an Gesamtcholesterin war in den SNTB2  $-/-$  Tieren deutlich vermindert, ebenso wie die freien Fettsäuren. Die SNTB2  $-/-$  Mäuse zeigten nach Insulininjektion eine deutlichere Abnahme der freien Fettsäuren und des Glycerins im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Dies könnte eine bessere Insulinsensitivität der Fettgewebe der SNTB2  $-/-$  Mäusen nach Hochfettdiät anzeigen. Die SNTB2 defizienten Mäuse hatten geringere Mengen an freiem Glycerin im Serum. Die Konzentration an Glukagon war ebenso wie Insulin in beiden Tiergruppen vergleichbar. Die Insulininjektion führte zu einer schwachen Abnahme des Glukosespiegels, allerdings war auf Grund der geringen Tierzahlen dies nicht signifikant. Der Nüchternglukosespiegel war in den SNTB2 defizienten Tieren deutlich erniedrigt. Die Adipokine Adiponektin und Chemerin zeigten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen.



Die postprandiale Veränderung der Serumparameter wurde ebenfalls untersucht (Tabelle 8). Hierzu wurden die Wildtyp und die SNTB2 -/- Mäuse über Nacht gefastet, anschließend für 2 h gefüttert und retrobulbär Blut entnommen.

Gefütterte Serumspiegel	<b>C57BL/6</b>	<b>SNTB2 -/-</b>	<b>p Value</b>
Anzahl der Tiere	8	7	
TG [mg/ml]	1,67 (1,07 – 2,27)	1,56 (0,66 – 1,96)	
Cholesterin [mg/dl]	47,44 (42,68 – 59,47)	41,54 (24,52 – 48,12)	p = 0.009
FFA [mM]	0,08 (0,04 – 0,13)	0,03 (0,02 – 0,12)	p = 0.028
Anzahl der Tiere	3	3	
Freies Glyzerin [nmol]	26,82 (25,60 – 28,29)	17,46 (6,81 – 19,41)	p = 0.050
Glukagon [ng/ml]	129,95 (125,01 – 143,92)	167,03 (114,84 – 171,63)	
Anzahl der Tiere	8	7	
Insulin [µg/ml]	3,96 (1,88 – 8,84)	3,26 (1,56 – 8,62)	
Glukose [mg/dl]	136,40 (94,91 – 159,80)	129,15 (87,70 – 187,40)	

Tabelle 8: Darstellung der Serumparameter der gefütterten Mäuse.

Entsprechend der Nüchternwerte hatten die gefütterten SNTB2 -/- Mäuse ebenfalls gleiche Mengen an Triglyzeriden und reduziertes Gesamtcholesterin im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. In den SNTB2 defizienten Mäusen waren die freien Fettsäuren vermindert ähnlich wie das freie Glyzerin. Glukagon, Insulin und Glukose waren in beiden Gruppen vergleichbar.

### 3.7.2 Insulinwirkung und Glukosetoleranz

In den Nüchternserumwerten und auch nach Fütterung zeigten sich keine Unterschiede im Insulinspiegel der Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäuse. Allerdings hatten die SNTB2 -/- Mäuse signifikant reduzierte Nüchternglukosespiegel. Um zu untersuchen, ob das Fehlen von SNTB2 einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel der Tiere hat, wurde ein intraperitonealer Glukose Toleranz Test (IPGTT) und ein intraperitonealer

Insulinsensitivitätstest durchgeführt. Im IPGTT zeigten die *SNTB2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine leicht gestörte Glukosetoleranz (Abbildung 33 A) und eine normale Insulinsensitivität (Abbildung 33 B).

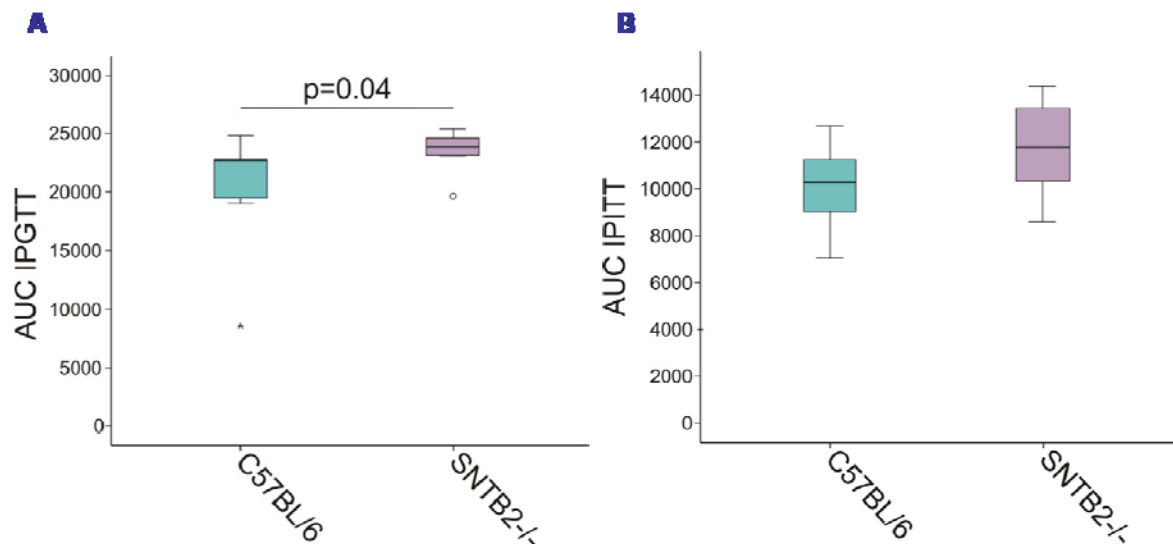


Abbildung 33: Ergebnisse der Glukose (IPGTT; A) und Insulin (IPITT; B) Toleranz Tests der C57BL/6 und *SNTB2* defizienten Mäuse dargestellt als area under the curve AUC.

Neben der Glukose und Insulin Toleranz Tests wurden auch die verschiedenen Fettgewebe und die Lebern der Tiere mit Insulin bzw. H<sub>2</sub>O Injektion untersucht. Hierfür wurden im Westernblot die Expression der Proteinkinase B (AKT) basal und in ihrer aktivierten Form, die durch Phosphorylierung vermittelt wird, untersucht. Sowohl in der basalen, als auch in der phosphorylierten Form konnten keine Unterschiede im Expressionsniveau im subkutanen, epididymalen, perirenal und braunen Fettgewebe der Wildtyp und *SNTB2*<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden, was für eine vergleichbare Insulinsensitivität der Fettdepots der *SNTB2* Knockout und Wildtyp-Tiere spricht (Abbildung 34).

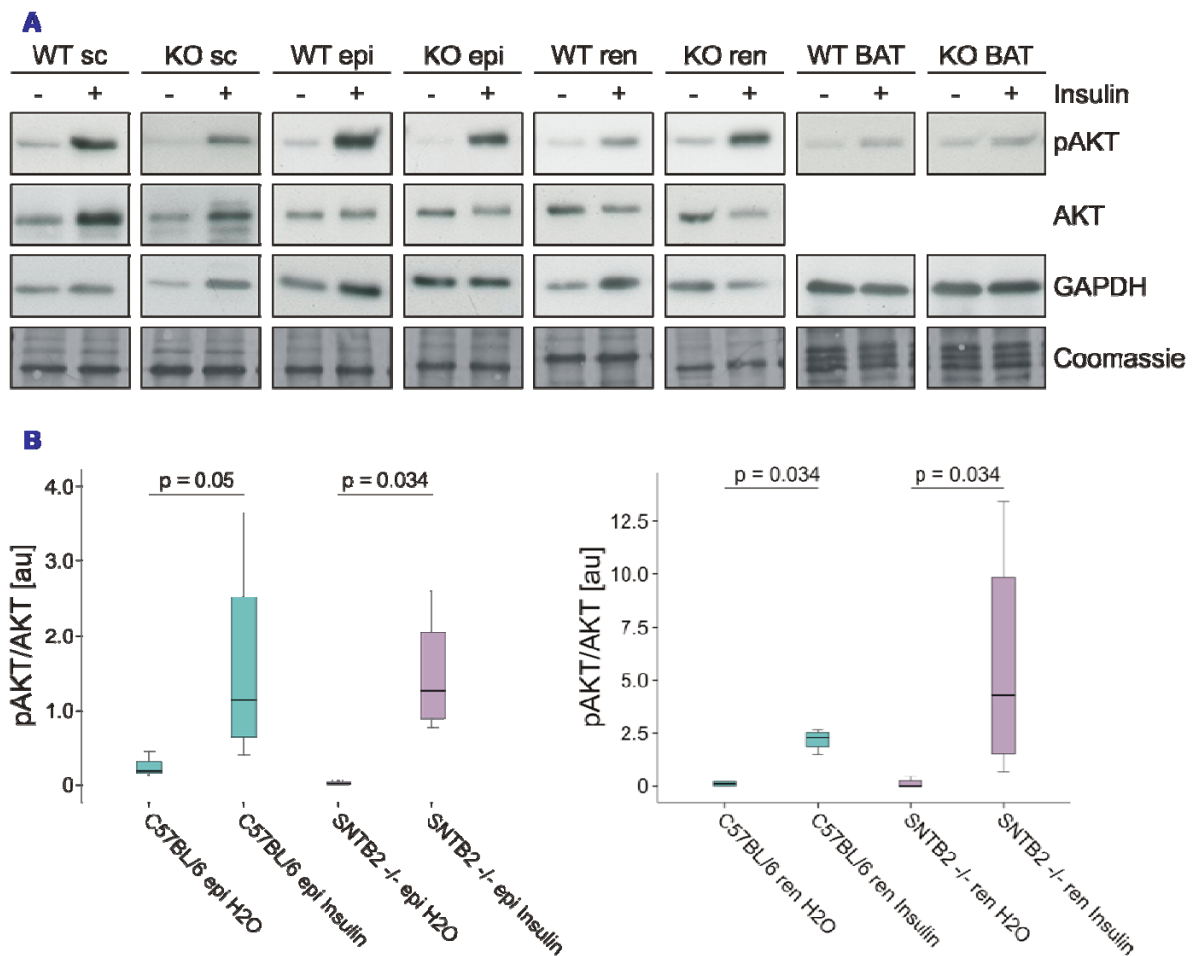


Abbildung 34: Analyse der Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) in verschiedenen Fettdepots (sc subkutan, epi epididymal, ren perirenal, BAT braunes Fettgewebe).

(A) Immunoblotanalysen verschiedener Fettdepots von pAKT und AKT. GAPDH und die Coomassiefärbung dienten als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung der Westernblots von epididymalen und perirenenal Fettdepots aus 6 C57BL/6 Mäusen und 6 SNTB2 defizienten Mäusen (jeweils 3 mit Insulininjektion und 3 mit H<sub>2</sub>O-Injektion).

Vergleichbar mit den Expressionsanalysen in den verschiedenen Fettdepots, ergaben die Untersuchungen der Leber ähnliche Resultate. Die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung der Proteinkinase B war sowohl in Wildtyp als auch in SNTB2 defizienten Mäuse durch Injektion mit Insulin deutlich zu erkennen (Abbildung 35). Auch in der Leber war kein Unterschied in der Insulin-vermittelten Phosphorylierung der AKT der Wildtyp und SNTB2 Knockout Mäuse zu erkennen.

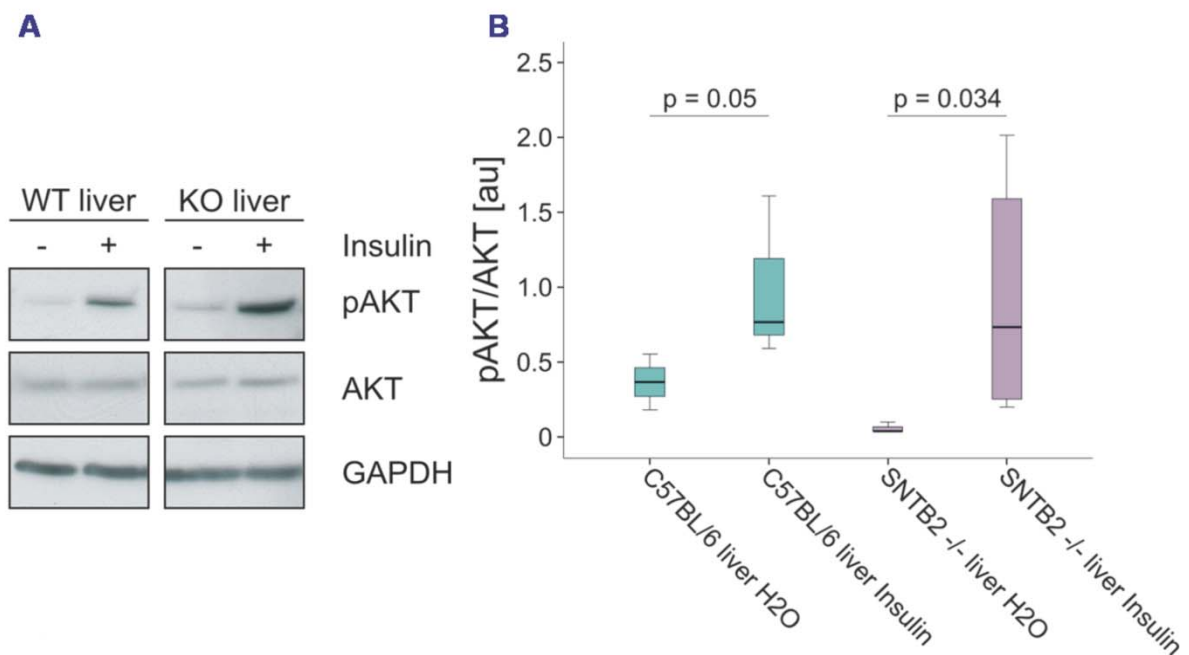


Abbildung 35: Analyse der Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) in den Leberproben

(A) Immunoblotanalysen der Leber von pAKT und AKT. Die GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung der Westernblots von Leberproben aus 6 C57BL/6 Mäusen und 6 SNTB2 defizienten Mäusen (jeweils 3 mit Insulininjektion und 3 mit H<sub>2</sub>O-Injektion).

Die Ergebnisse aus den Toleranz Tests und den Westernblotanalysen zeigten somit, dass die SNTB2 -/- Mäuse eine Insulinsensitivität entsprechend ihrer Wildtypkontrollen aufwiesen.

### 3.7.3 Analyse der Fettdepots

Nach 24-wöchiger Hochfettdiät wiesen die SNTB2 defizienten Mäuse reduzierte Fettgewebismengen auf (Tabelle 6). Eine in diesem Fall durch Diät induzierte Adipositas resultiert gewöhnlich aus einer Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie) und einer Vergrößerung der Zellvolumina (Hypertrophie). Um den Einfluss der SNTB2 Defizienz auf die Fettgewebe zu überprüfen wurden die verschiedenen Fettdepots histologisch und physiologisch untersucht.

#### 3.7.3.1 Morphologie der Fettdepots

Subkutanen, epididymalen und perirenales Fettgewebe wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und HE gefärbt. Zur Bestimmung der Zell-Volumina wurden die Adipozyten vermessen und anschließend in verschiedene Gruppen eingeteilt (Adipozytenvolumen/Gewicht des Fettgewebes). Sowohl für Wildtyp als auch für SNTB2 Knockout

Mäuse wurden so viele Adipozyten vermessen, bis eine Gesamtfläche von ca 40000  $\mu\text{m}^2$  erzielt war. In Abbildung 36 ist das Histogramm der Verteilung der Adipozytengrößen und die HE Färbung des subkutanen Fetts der Wildtyp und SNTB2 Knockout Mäuse dargestellt.

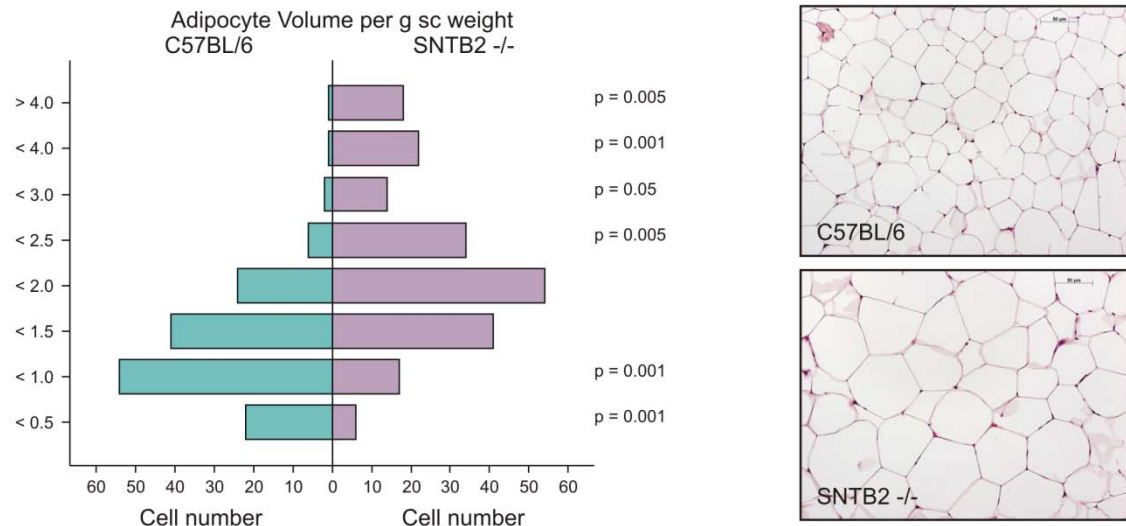


Abbildung 36: Histogramm der Verteilung der Adipozytengröße in subkutanen Fettgeweben und immunhistochemische Darstellung der HE gefärbten Paraffinschnitte.

Im subkutanen Fettgewebe der defizienten Tiere waren erheblich weniger kleine (< 1,0 [Volumen/sc Gewicht]), dafür mehr große (> 2,5) Adipozyten. Des Weiteren hatten die SNTB2 -/- Fettgewebe weniger Adipozyten, da pro Gesichtsfeld weniger Adipozyten zu erkennen waren und das Fettgewebe an sich kleiner war als das Fettgewebe der Wildtyp-Tiere. In Abbildung 37 ist die Analyse des epididymalen Fettdepots dargestellt.

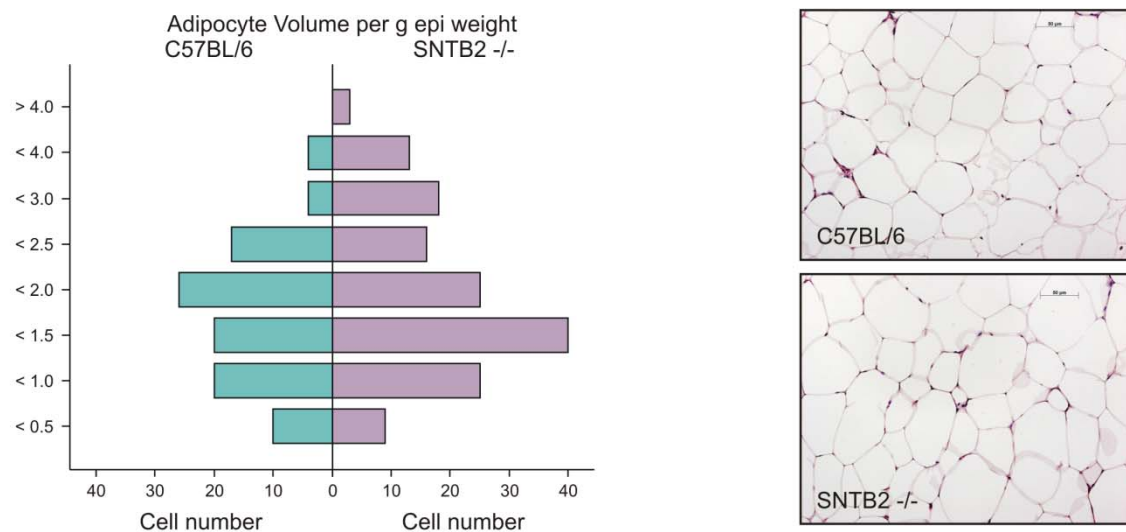


Abbildung 37: Histogramm der Verteilung der Adipozytengröße in epididymalen Fettgeweben und immunhistochemische Darstellung der HE gefärbten Paraffinschnitte.

Im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe fanden sich im epididymalen Fettdepot keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *SNTB2*<sup>-/-</sup> Mäusen.

Als weiteres Fettgewebe wurde das perirenale Fettdepot untersucht (Abbildung 38).

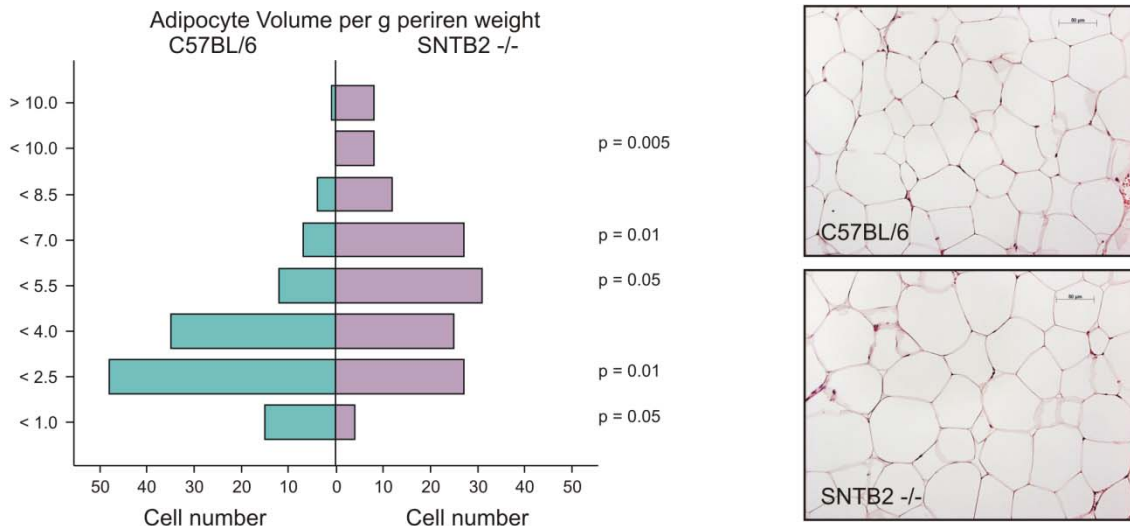


Abbildung 38: Histogramm der Verteilung der Adipozytengröße in perirenenal Fettgewebe und immunhistochemische Darstellung der Paraffinschnitte.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Untersuchungen des subkutanen Fettgewebes waren im perirenenal Fettgewebe deutlich weniger kleine ( $< 2,5$ ) und mehr große ( $> 5,5$ ) Adipozyten zu erkennen. Auch hier bestand das Fettgewebe aus weniger Zellen als das Fettgewebe der Wildtyp-Tiere.

Die *SNTB2*<sup>-/-</sup> Mäuse hatten somit eine verminderte Zahl an Adipozyten im subkutanen und perirenenal Fett wobei hier das Zellvolumen vergrößert ist.

Lipidtropfen-assoziierte Proteine der PAT Familie steuern die Speicherung und Freisetzung von Lipiden und können so die Größe der Lipidtropfen beeinflussen. Westernblotanalysen zeigten jedoch, dass Perilipin, Adipophilin und FSP27 im subkutanen, epididymalen und perirenenal Fett nicht durch die *SNTB2* Defizienz beeinflusst waren und so die größeren Adipozyten nicht erklären konnten (Abbildung 39).

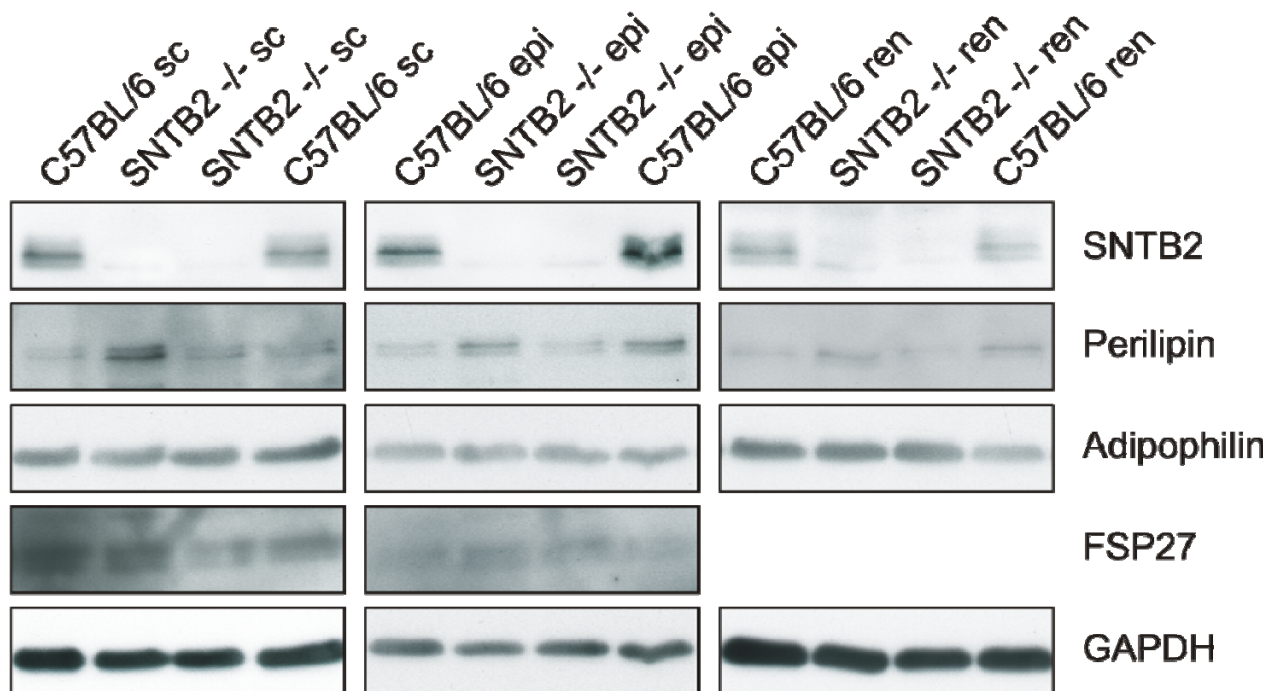


Abbildung 39: Westernblotanalysen von SNTB2 und den Lipidtropfen-assoziierten Proteinen Perilipin, Adipophilin und FSP27 in subkutanen (sc), epididymalen (epi) und perirenal (ren) Fettgewebslysaten von Wildtyp C57BL/6 und SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen. Die GAPDH diente als Beladungskontrolle.

### 3.7.3.2 Lipidspeicherung und –freisetzung

Die Veränderungen der Morphologie der Fettgewebe waren deutlich in den SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen ausgeprägt. Um zu untersuchen, wie diese Fettzellhypertrophie sich auf die Lipidspeicherung und –freisetzung auswirkt, wurden die verschiedenen Fettgewebe der SNTB2 Knockout Mäuse und ihrer entsprechenden Wildtypkontrollen analysiert.

#### 3.7.3.2.1 Gespeicherter Lipidgehalt

Die *in vitro* Versuche in 3T3-L1 Zellen zeigten, dass die Verminderung von SNTB2 mit einer Adipozytenhypertrophie und einem geringerem Gehalt an gespeicherten Triglyzeriden assoziiert ist. Die Untersuchungen der Fettdepots der SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse zeigte hypertrophe Adipozyten im renalen und subkutanen Fett. In Abbildung 40 A ist dargestellt, dass SNTB2 <sup>-/-</sup> Tiere im subkutanen und braunen Fett weniger Triglyzeride speichern als die Wildtyp-Tiere. Die beiden viszeralen Fettdepots, das epididymale und das perirenale Fettgewebe, speicherten vergleichbare Mengen Triglyzeride in SNTB2 <sup>-/-</sup> und Wildtyp Mäusen. Die Gesamtcholesterinmenge war in den Fettgeweben in beiden Tiergruppen gleich, allerdings



zeigte sich ein erhöhter Cholesteringehalt im epididymalen Fettgewebe der SNTB2 Knockout Tiere (Abbildung 40 B).

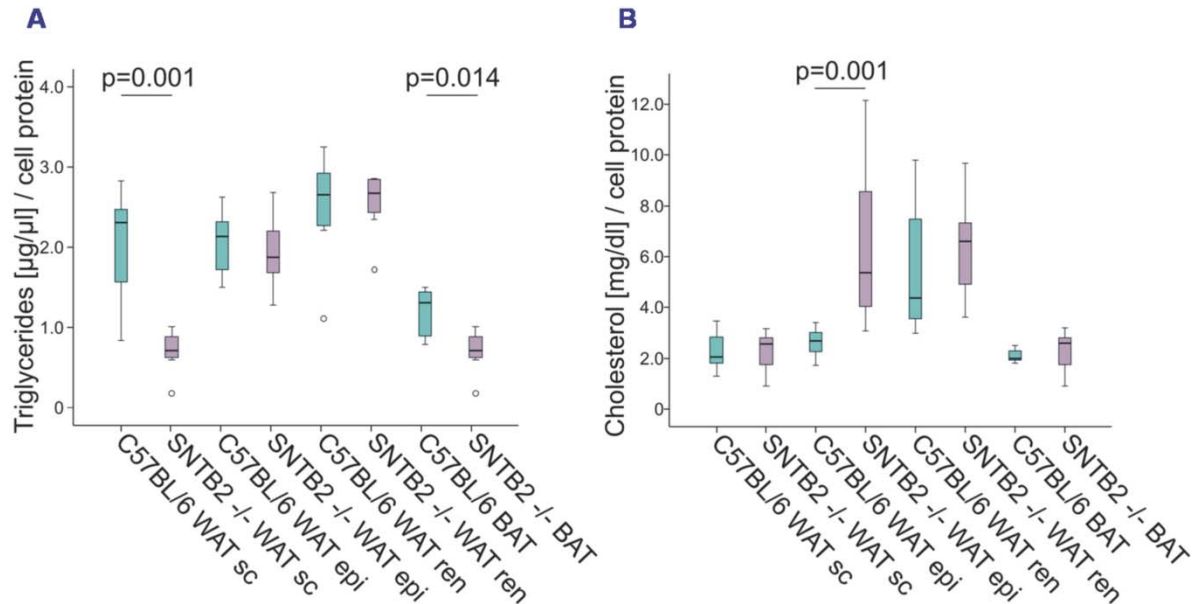


Abbildung 40: Konzentrationen an Trigylzeriden (A) und Gesamtcholesterin (B) in den verschiedenen weißen (WAT) subkutanen (sc), epididymalen (epi) und perirenaln (ren) und braunen (BAT) Fettdepots pro zelluläres Gesamtprotein.

### 3.7.3.2.2 Lipogene Enzyme und Lipasen

Im subkutanen Fettgewebe der SNTB2 -/- Mäuse waren, bezogen auf den Proteingehalt, weniger Triglyzeride gespeichert als im Fett der Wildtyp-Tiere. Untersuchungen der mRNA-Expression der lipogenen Enzyme SREBP1c, FAS und SCD-1 ergaben ebenfalls eine Reduktion der Expressions in den SNTB2 defizienten Mäusen (Abbildung 41).

Untersuchungen dieser Enzyme auf Proteinebene zeigten nur eine Reduktion der SCD-1 Expression in den Fettgeweben der SNTB2 Knockout Mäuse, während SREBP1c und FAS nicht beeinflusst waren (Daten nicht gezeigt).



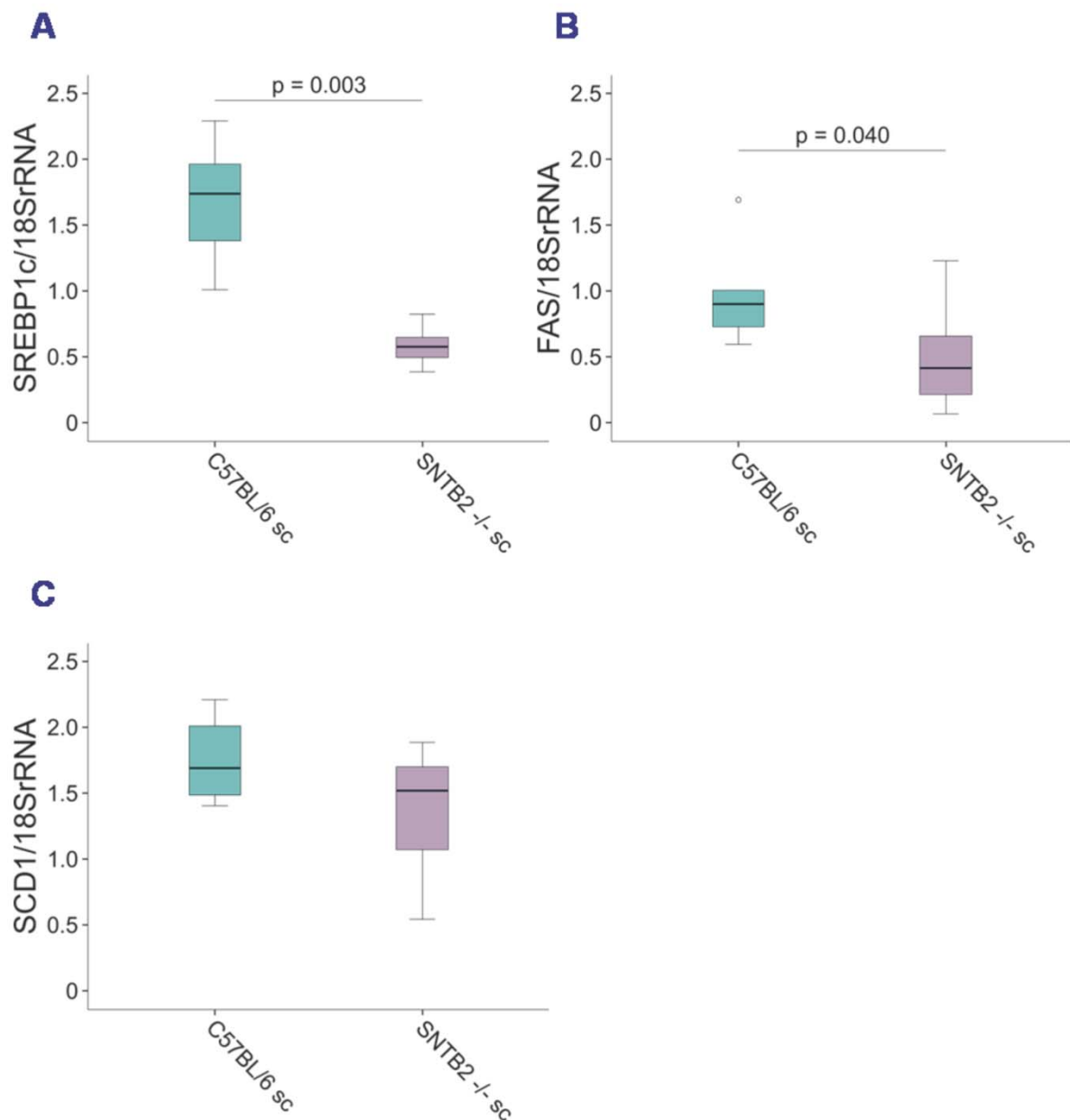


Abbildung 41: Analyse der mRNA-Expression von SREBP1c (A), FAS (B) und SCD-1 (C) im subkutanen Fettgewebe von C57BL/6 und SNTB2 -/- Mäusen. Die 18S rRNA diente zur Normalisierung.

Neben der Synthese von Fettsäuren beeinflusst auch die Lipolyseaktivität maßgeblich das Fettgewebe. cAMP ist als *second messenger* an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Lipolyse beteiligt. In Abbildung 42 ist der cAMP-Gehalt in den verschiedenen Fettdepots der Wildtyp und SNTB2 -/- Knockout Mäuse dargestellt. Der cAMP-Spiegel war deutlich in allen weißen Fettdepots der SNTB2 defizienten Mäuse erniedrigt, im braunen Fett jedoch erhöht.

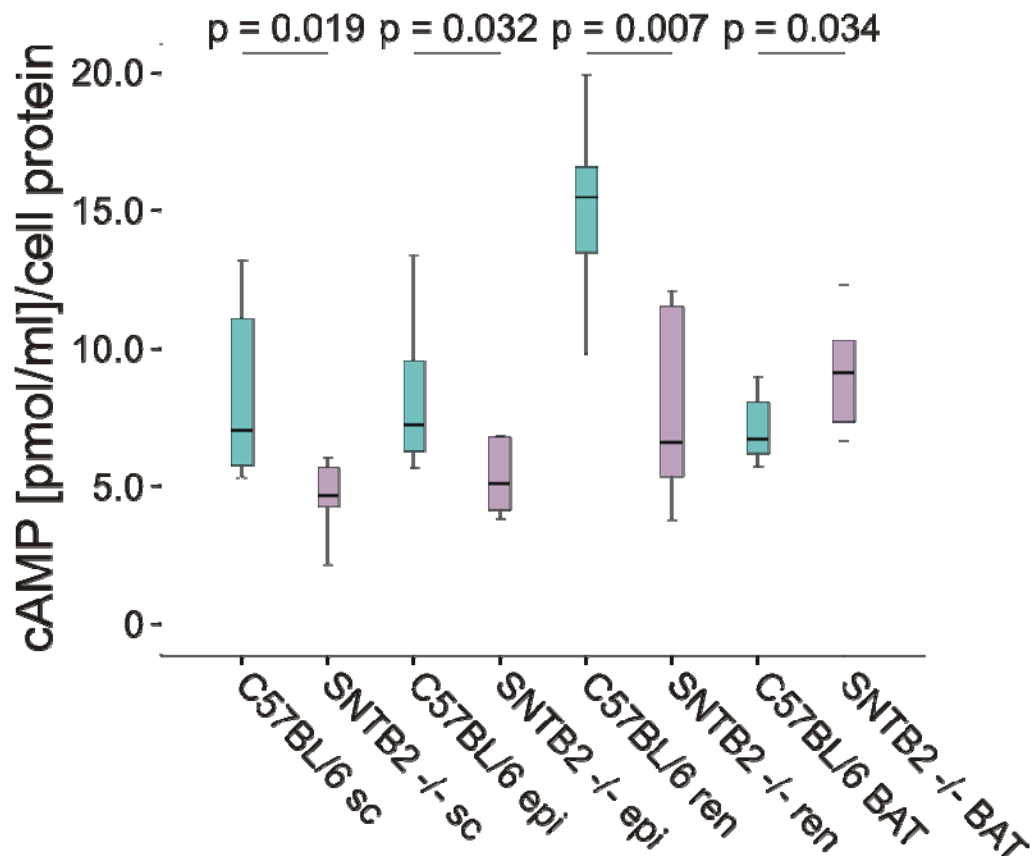


Abbildung 42: Analyse der cAMP-Spiegel in subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenal (ren) und braunen (BAT) Fettdepots von 8 C57BL/6 und 7 SNTB2 -/- Mäusen.

Obwohl die Menge an freiem Glycerin vermindert war (Tabelle 7 und Tabelle 8) und die cAMP-Spiegel ebenfalls reduziert vorlagen, zeigte die Analyse der Lipasen ATGL und HSL keine Veränderungen auf Proteinebene (Abbildung 43) durch die SNTB2 Defizienz.

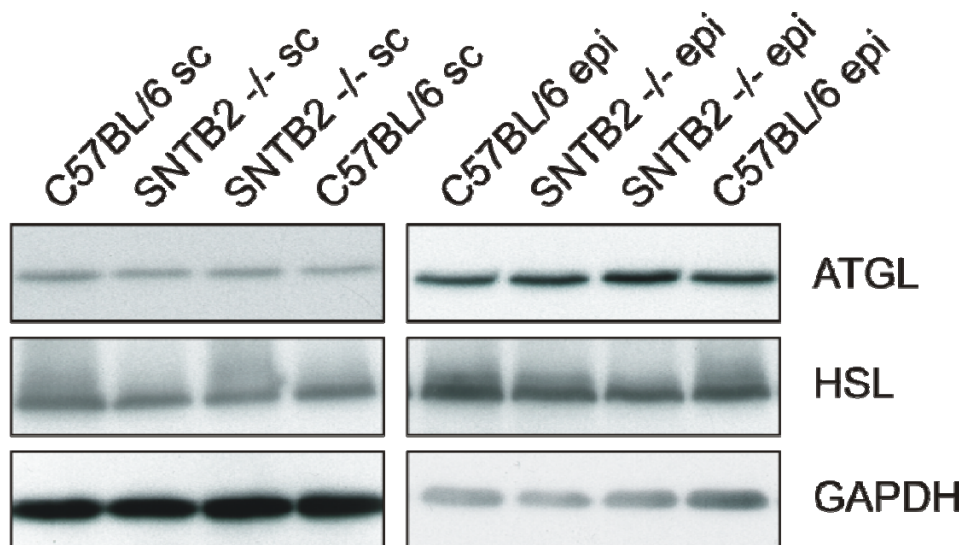


Abbildung 43: Immunoblotdarstellung von ATGL und HSL in subkutanen (sc) und epididymalen (epi) Fettdepots von C57BL/6 und SNTB2 -/- Mäusen. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

### 3.7.3.2.3 Cholesterinverteilung

Die Untersuchungen der gespeicherten Gesamtcholesterinmenge zeigten zwar keine Unterschiede zwischen Wildtyp und SNTB2  $-/-$  Mäusen in den verschiedenen Fettgeweben auf (Abbildung 40), allerdings waren die Cholesterinserumwerte stark vermindert.

Der Transkriptionsfaktor SREBP2 dient als Sensor der Cholesterinhomeostase und reguliert die intrazelluläre Synthese. Überdies konnten wir zeigen, dass aktives SREBP2 in hypertrophen Adipozyten erhöht vorlag.

Die verschiedenen Fettdepots der Wildtyp und SNTB2  $-/-$  Mäuse wurden auf Unterschiede in der Proteinexpression von SREBP2 untersucht.

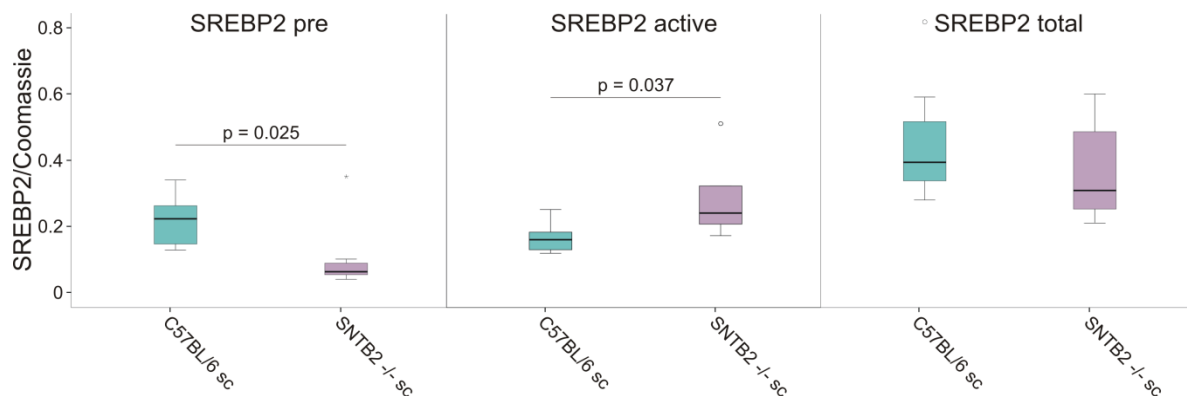


Abbildung 44: Auswertung der Immunoblotanalysen von SREBP2 als Vorläuferform (pre), aktiver Form (active) und Gesamtmenge (total) im subkutanen Fettgewebe. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

In den viszeralen – den epididymalen und perirenal – Fettdepots und auch im braunen Fettgewebe fanden sich keine Unterschiede in den SNTB2  $-/-$  zu ihren Wildtypkontrollen. Im subkutanen Fettdepot allerdings zeigte sich eine Induktion der Aktivierung von SREBP2 in den SNTB2 Knockout Mäusen (Abbildung 44). Die Vorläuferform wurde vermehrt zur aktiven Form gespalten, sodass weniger der Vorläuferform zu finden war und mehr der aktiven Form, während sich die Gesamtmenge an SREBP2 nicht veränderte.

ABCA1 beeinflusst ebenfalls die Cholesterinhomeostase indem es den Efflux von intrazellulärem Cholesterin vermittelt [63]. Auch eine Interaktion von ABCA1 und SNTB2 konnte bereits gezeigt werden. In Abbildung 45 sind die Immunoblotsanalysen von ABCA1 der verschiedenen Fettdepots der Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäuse aufgezeigt. Im subkutanen Fettgewebe der SNTB2  $-/-$  Mäusen befand sich mehr ABCA1 Protein, während in dem epididymalen und perirenal Fettgewebe nur eine tendenzielle Erhöhung der ABCA1 Expression zu finden war.

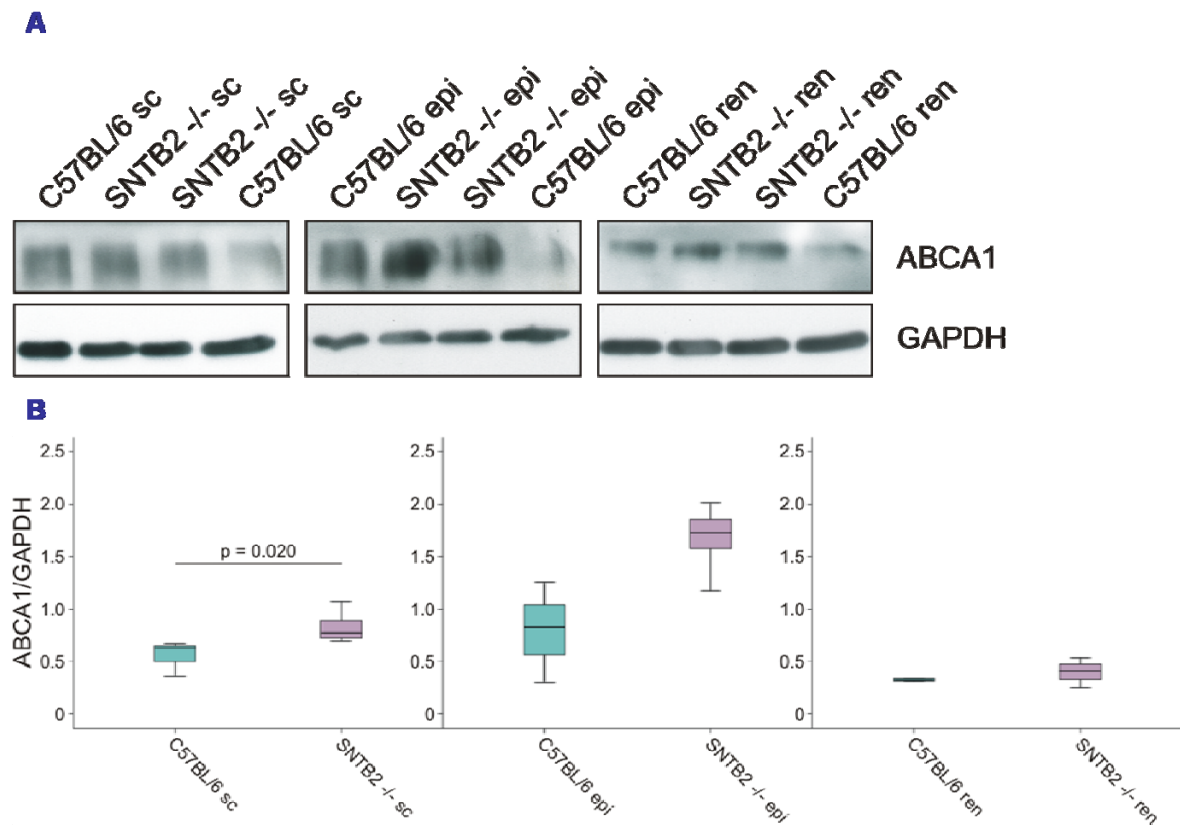


Abbildung 45: Analyse von ABCA1 in subkutanen (sc), epididymalen (epi) und perirenal (ren) Fettgewebslysaten (A) von Wildtyp und SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen und die Quantifizierung der Immunoblots (B). Als Kontrolle der Beladung und zur Normalisierung diente die GAPDH.

Des Weiteren bindet auch Caveolin-1 Cholesterin und Fettsäuren und ist am zellulären Transport von Cholesterin beteiligt [32]. In vitro zeigten Immunpräzipitationsexperimente eine Interaktion von Caveolin-1 und SNTB2. Untersuchungen des Expressionsniveaus auf Proteinebene von Caveolin-1 zeigten eine deutlich verminderte Expression von Caveolin-1 in subkutanen und perirenal Fettgeweben von SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen, In den epididymalen und braunen Fettdepots war dies nicht nachzuweisen (Abbildung 46). Da Insulin keinen Einfluss auf die Caveolin-1 Expression hat (eigene Beobachtungen) wurden auch diese Gewebe in die Analysen mit einbezogen.

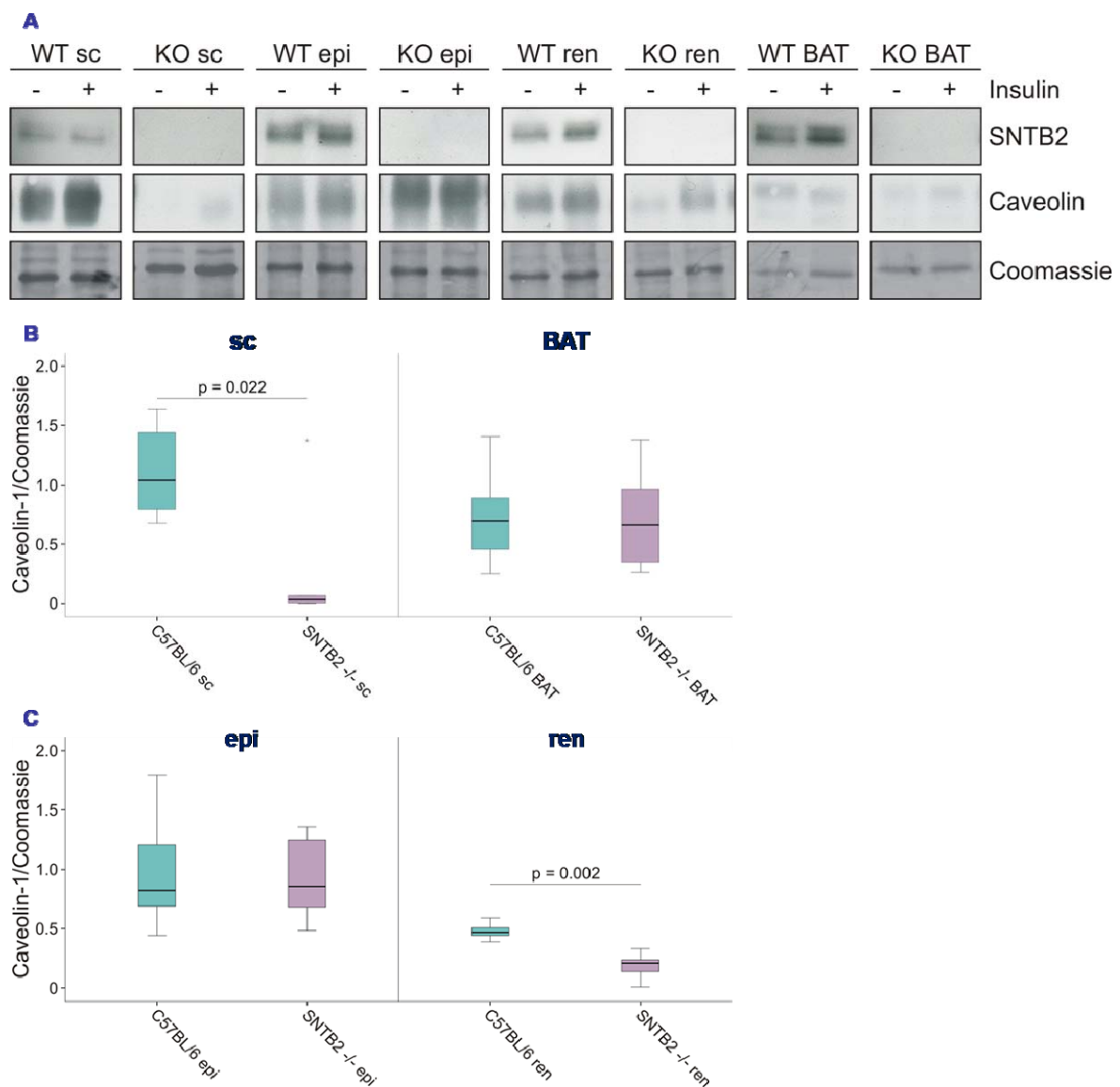


Abbildung 46: Analyse von Caveolin-1 auf Proteinebene

(A) Caveolin-1 in subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenen (ren) und braunen (BAT) Fettlysaten von Wildtyp und SNTB2<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Coomassiefärbung diente als Beladungskontrolle.

(B) Quantifizierung der Immunoblots beschrieben in A von subkutanen (sc), braunen (BAT), epididymalen (epi) und renalen (ren) Fettgeweben von 8 C57BL/6 und 7 SNTB2 defizienten Mäusen mit Insulin bzw. H<sub>2</sub>O Injektion. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

Die mRNA-Expressionsanalysen von Caveolin-1 ergaben ähnliche Resultate wie die Untersuchungen der Proteinexpression von Caveolin-1. Im subkutanen Fettgewebe zeigte sich eine starke Reduktion der Expression von Caveolin-1 in den SNTB2 Knockout Tieren, während in den anderen Fettdepots lediglich eine Tendenz zu erkennen war (Abbildung 47).

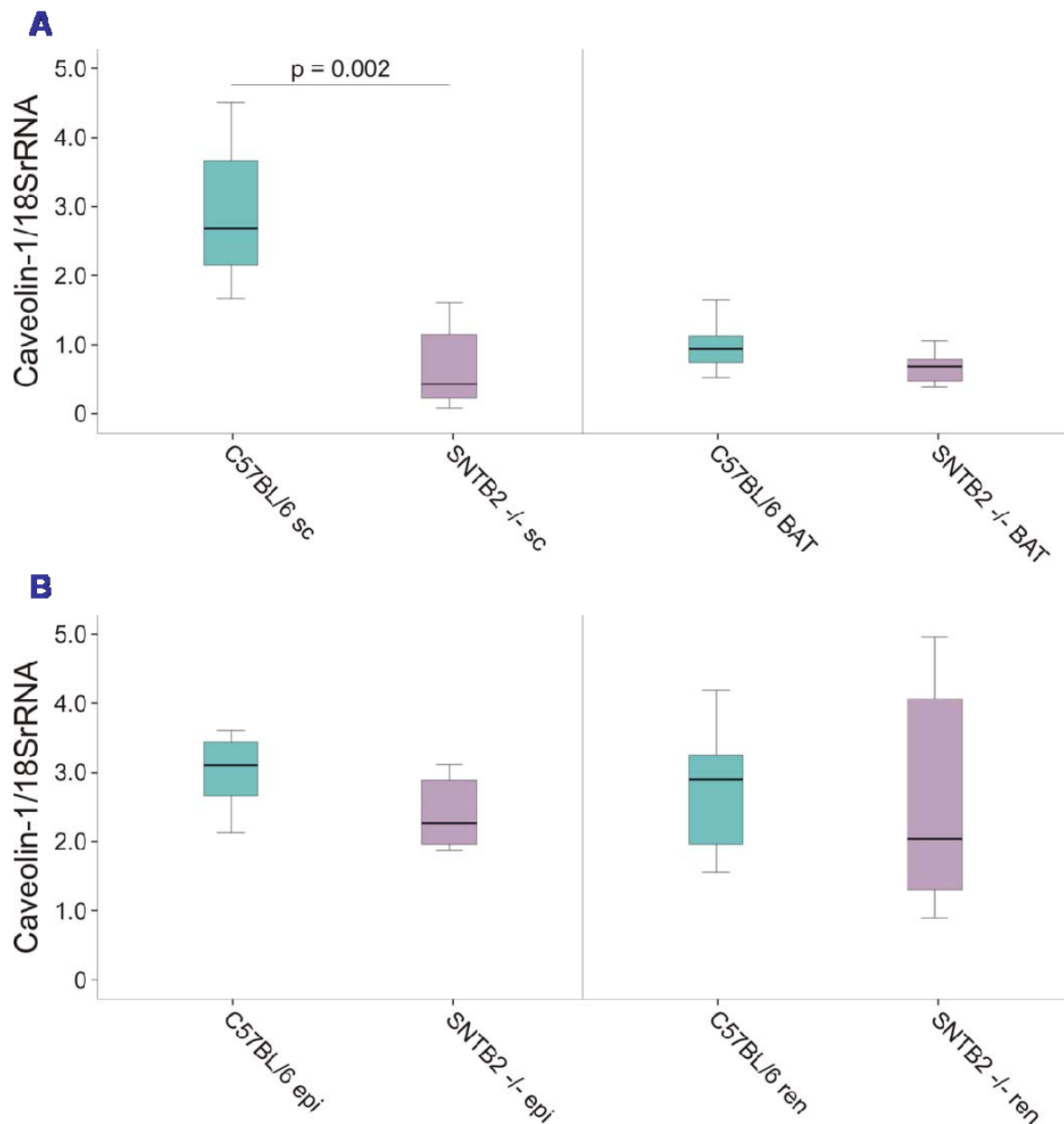


Abbildung 47: mRNA-Expressionsanalyse von Caveolin-1

(A) Caveolin-1 in subkutanen (sc) und braunen (BAT) Fettgeweben von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen. Die 18S rRNA diente zur Normalisierung.

(B) Caveolin-1 in viszeralen (epi und ren) Fettgeweben von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen. Die 18S rRNA diente zur Normalisierung.

### 3.7.3.3 Entzündungsreaktion im Fettgewebe

Eine Hypertrophie der Adipozyten geht häufig mit einer chronischen Entzündung und einer verstärkten Akkumulation von Makrophagen einher [12]. Untersuchungen des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und des Makrophagenmarkers F4/80 auf mRNA-Ebene zeigten allerdings keine Unterschiede in den Fettdepots der Wildtyp Tiere und den hypertrophen Fettgeweben der SNTB2 -/- Mäuse, wie in Tabelle 9 dargestellt ist. Es ist

bekannt, dass sich die viszeralen Fettdepots zu den subkutanen Fettdepots durch eine höhere lokale Entzündung unterscheiden. Aus Tabelle 9 geht ebenfalls hervor, dass F4/80 in den viszeralen Fettdepots stärker exprimiert war als in den subkutanen Fettdepots.

	<b>C57BL/6</b>	<b>SNTB2 -/-</b>
Anzahl der Tiere	8	7
IL-6 sc	0,053 (0,02 – 0,17)	0,135 (0,04 – 0,26)
IL-6 epi	0,303 (0,04 – 1,51)	0,919 (0,18 – 7,97)
IL-6 ren	0,125 (0,05 – 0,48)	0,125 (0,05 – 0,14)
IL-6 BAT	0,157 (0,01 – 0,34)	0,094 (0,01 – 0,16)
F4/80 sc	0,443 (0,28 – 0,67)	0,679 (0,25 – 0,82)
F4/80 epi	1,531 (0,38 – 3,88)	0,669 (0,34 – 3,44)
F4/80 ren	1,458 (0,65 – 2,09)	1,057 (0,61 – 3,15)
F4/80 BAT	0,131 (0,11 – 0,26)	0,106 (0,10 – 0,15)

Tabelle 9: mRNA-Expression von IL-6 und F4/80 in subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenalren (ren) und braunen (BAT) Fett von C57BL/6 und SNTB2 -/- Mäusen. Zur Normalisierung diente die 18S rRNA. Keine signifikanten Unterschiede waren zwischen Wildtyp und SNTB2 -/- Tieren zu erkennen.

Um Unterschiede in der Entzündungsreaktion genauer zu untersuchen, wurden Fettgewebekulturen angelegt und die IL-6 Freisetzung der Fettstücke im basalen und im durch LPS stimulierten Zustand analysiert. Abermals konnte beobachtet werden, dass die viszeralen Fettgewebe höhere Mengen an IL-6 sezernieren (Daten nicht gezeigt), sich die Freisetzung von IL-6 zwischen Wildtyp und SNTB2 -/- Tieren nicht unterscheidet, weder im basalen noch im mit LPS stimulierten Zustand (Abbildung 48). Die Fettzellhypertrophie ging also nicht mit einem erhöhten Entzündungszustand einher.

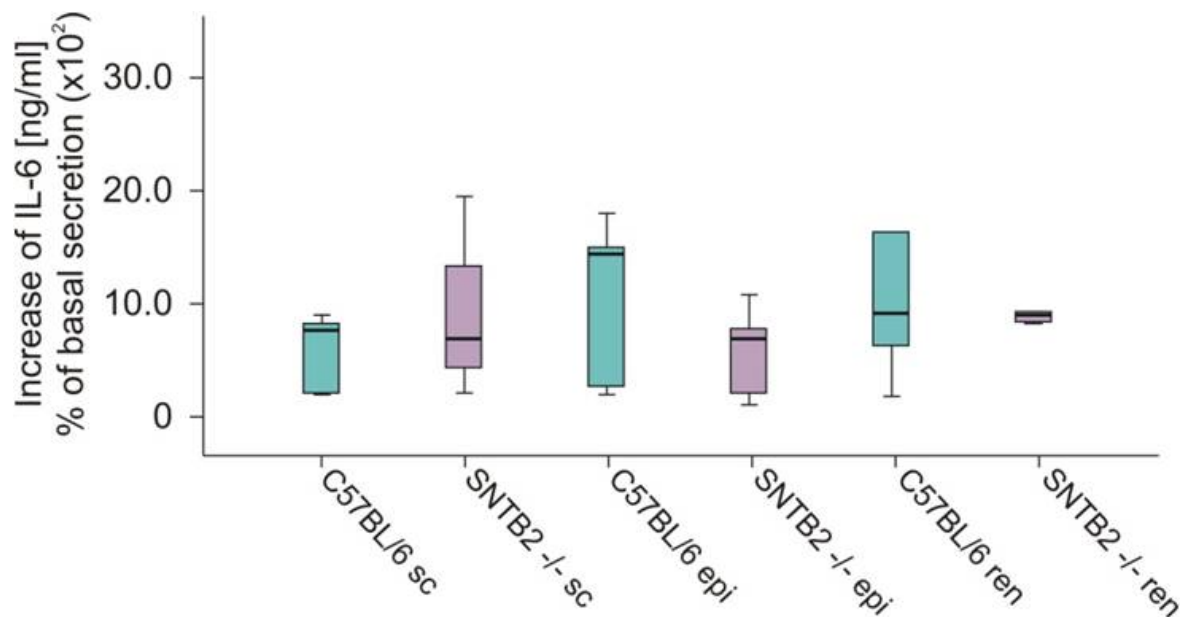


Abbildung 48: Analyse der Induktion der IL-6 Sekretion nach LPS-Stimulation. Verhältnis der Freisetzung von IL-6 des basalen Zustands zum induzierten Zustand in Gewebekulturen von subkutanen (sc), epididymalen (epi) und perirenalren (ren) Fettgeweben von Wildtyp und SNTB2 Knockout Mäusen.

### 3.7.4 Veränderungen in der Leber

Die Leber spielt neben dem Fettgewebe eine entscheidende Rolle in der Regulation des Fettsäuremetabolismus und der Energiehomeostase des Körpers. Unterschiede in der Insulinsensitivität der Leber der Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäusen wurden nicht beobachtet (IPITT Abbildung 33 B und AKT Phosphorylierung, Abbildung 35).

#### 3.7.4.1 Gespeicherte Lipide

Die SNTB2 Defizienz führte in den subkutanen Fettdepots zu einer Verminderung der gespeicherten Triglyzeride. In den Lebern der SNTB2 -/- Tiere waren ebenfalls reduzierte Mengen an gespeicherten Trigylzeriden zu finden, während die Gesamtcholesterinmenge in den Lebern deutlich erhöht war (Abbildung 49).



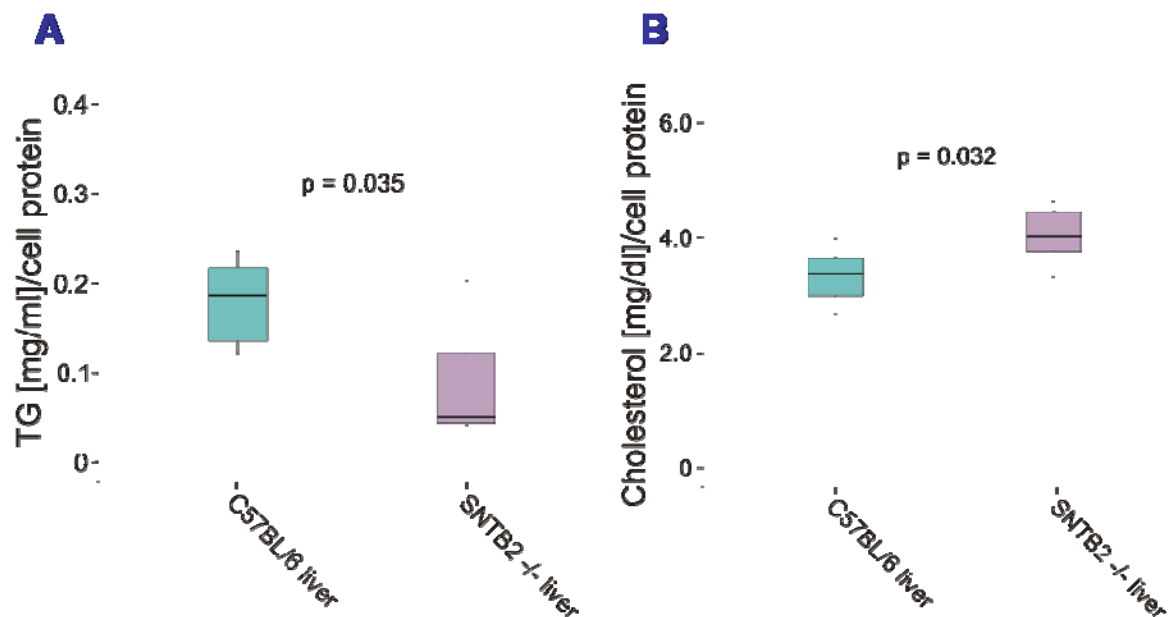


Abbildung 49: Triglyzerid- (A) und Gesamtcholesteringehalt (B) in Leberlysaten von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration.

### 3.7.4.2 Cholesterinverteilung in der Leber

Da Cholesterin in den Lebern der SNTB2 defizienten Mäuse erhöht vorlag, wurden die Leberproben auf Unterschiede in der Expression von Proteinen, die die Cholesterinhomeostase regulieren, untersucht. In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass die Proteinexpression von ABCA1 nicht durch die SNTB2 Defizienz beeinflusst war.

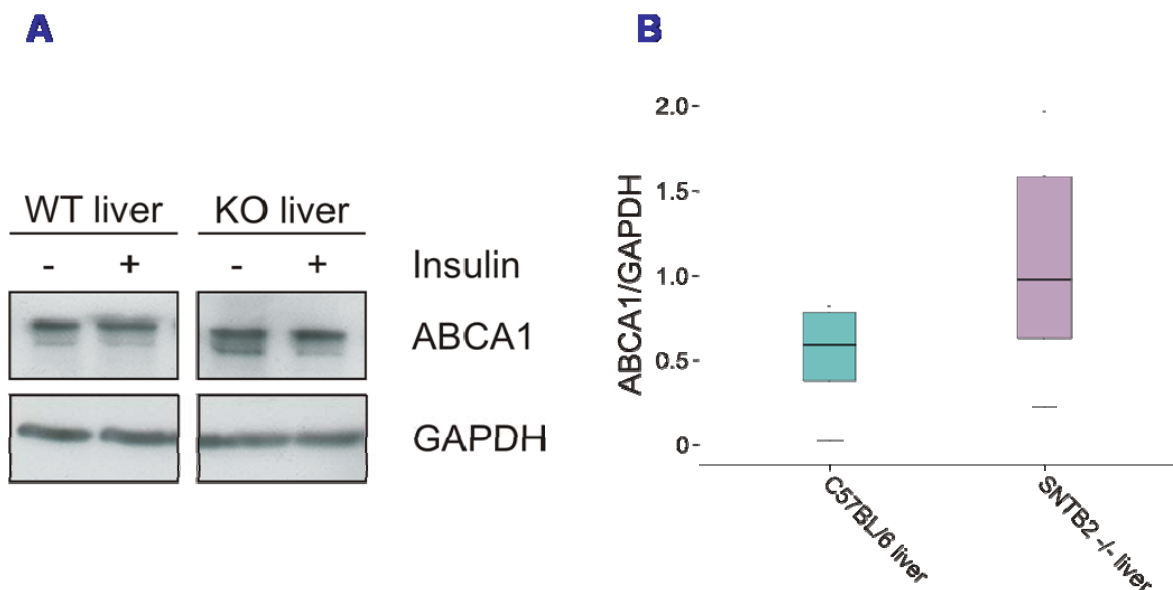


Abbildung 50: ABCA1 in Leberlysaten von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen.

(A) Immunoblotanalyse von ABCA1. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von ABCA1 von Leberlysaten aus 8 Wildtyp und 7 SNTB2 -/- Mäusen. Die GAPDH diente zur Normalisierung.

Caveolin-1 hingegen lag auf Proteinebene (Abbildung 51 A und B) deutlich induziert in den Leberlysaten der SNTB2 Knockout Mäuse vor, während auf mRNA-Ebene keine Unterschiede auftraten (Abbildung 51 C). Im Gegensatz zu den Fettgewebslysaten, in denen Caveolin-1 reduziert vorlag, war in den Lebern Caveolin-1 induziert.

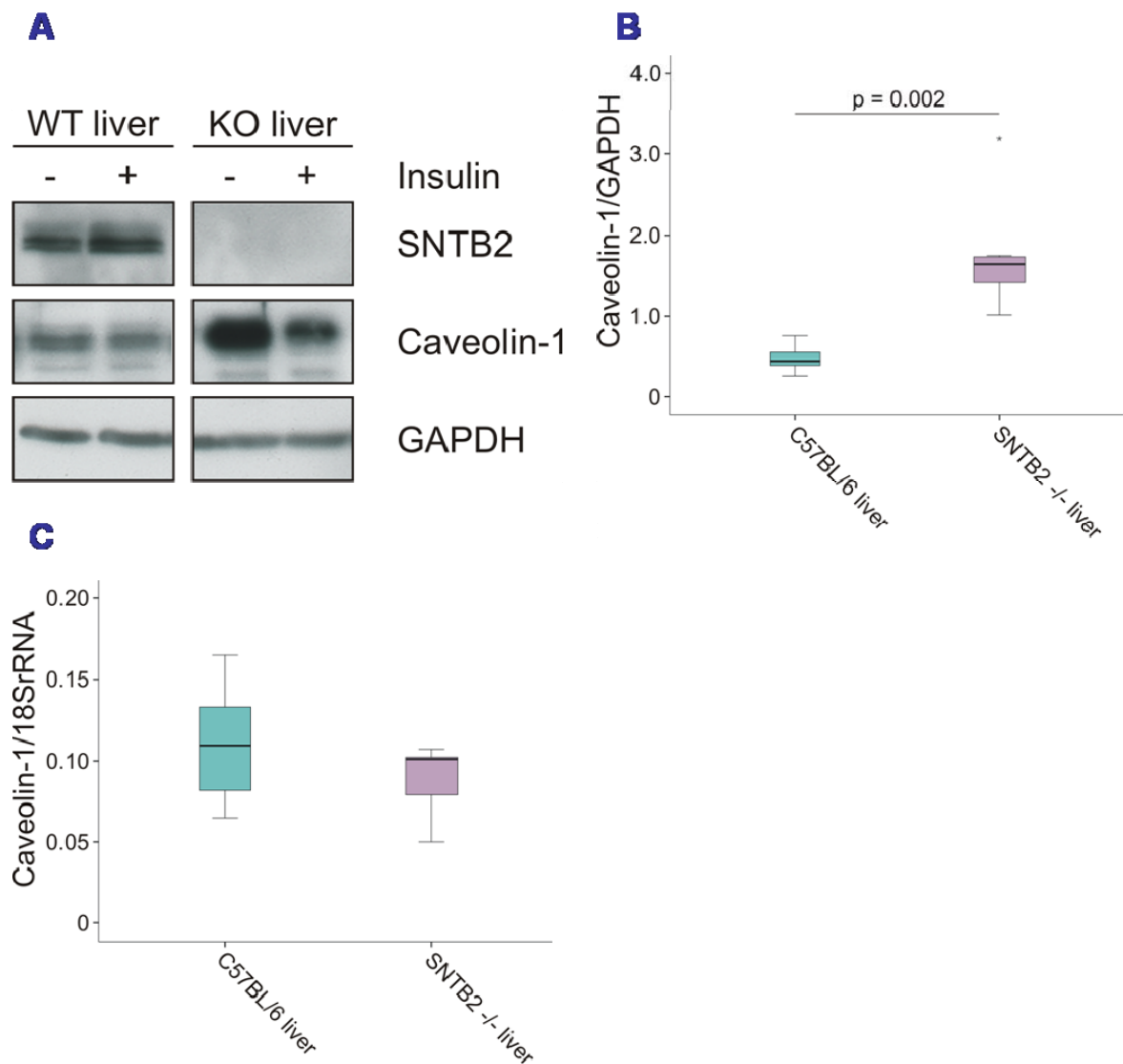


Abbildung 51: Analyse von Caveolin-1 in Leberlysaten von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen.

(A) Immunoblotanalyse von SNTB2 und Caveolin-1. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von Caveolin-1 von Leberlysaten aus 8 Wildtyp und 7 SNTB2 -/- Mäusen. GAPDH diente zur Normalisierung.

(C) mRNA-Expressionsanalyse von Caveolin-1 in Lebern aus 8 Wildtyp und 7 SNTB2 -/- Mäusen. 18SrRNA diente zur Normalisierung.

Immunhistologische Färbungen von Caveolin-1 in Leberschnitten zeigten ebenfalls ein stärkeres Vorkommen des Proteins in den SNTB2 -/- Mäusen. In Abbildung 52 sind

Portalfelder der Leber dargestellt. Die Caveolin-1 Färbung war in den Wildtyp Tieren in den Zellen des Gallengangs und den Zellen der Pfortader zu erkennen, während in den SNTB2 defizienten Mäusen auch die Hepatozyten deutlich angefärbt waren.

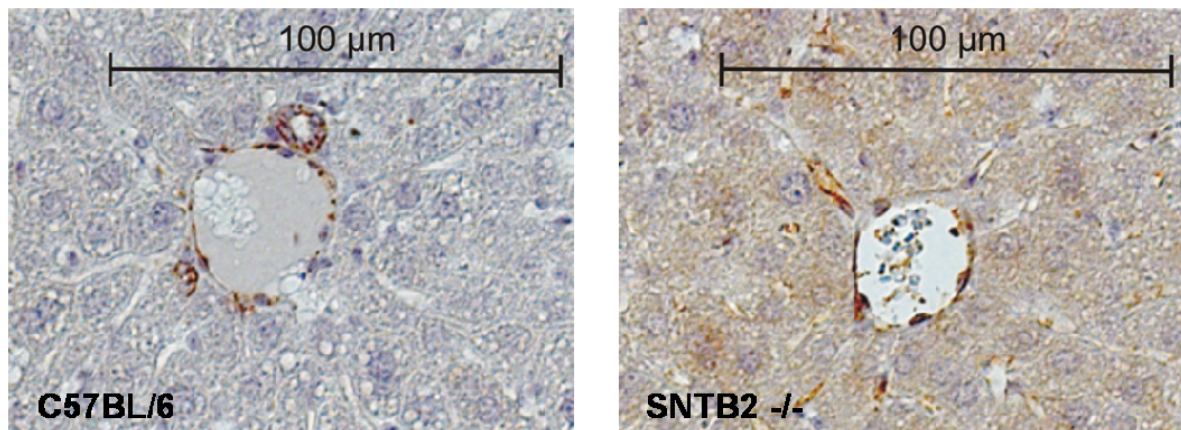


Abbildung 52: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Caveolin-1 gefärbten Paraffinschnitten der Leber von Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäusen.

Neben der Regulation der Cholesterinhomeostase hat Caveolin-1 auch antiinflammatorische Effekte, welche durch die Bindung an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelt werden können [92]. In den Lebern der SNTB2  $-/-$  Mäuse waren zwar erhöhte Mengen an Caveolin-1 zu finden, einen Einfluss auf die Proteinexpression von TLR4 hatte die Defizienz jedoch nicht (Abbildung 53).

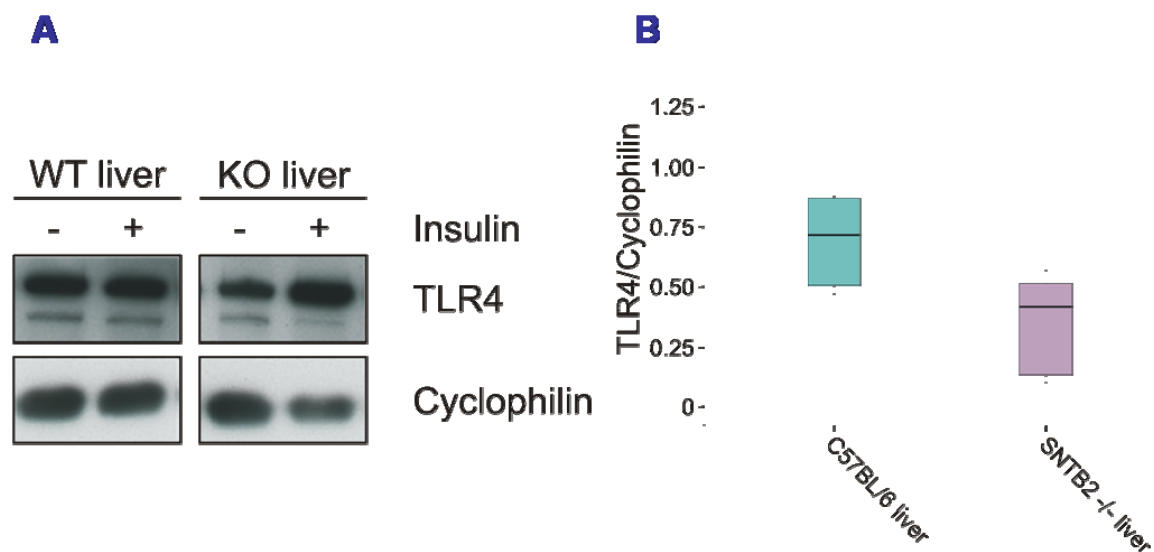


Abbildung 53: Analyse von TRL4 in Leberlysaten von Wildtyp und SNTB2  $-/-$  Mäusen.

(A) Immunoblotanalyse von TRL4. Cyclophilin diente als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von TLR4 in Leberlysaten aus 8 Wildtyp und 7 SNTB2  $-/-$  Mäusen. Cyclophilin diente zur Normalisierung.

### 3.7.4.3 Glukoneogenese, Fettsäuresynthese und Glukoseaufnahme

Die Leber ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Energiehomeostase im Körper. Zur Untersuchung der Aktivität einiger Enzyme, die den Metabolismus der Leber regulieren, wurden die Leberlysate analysiert. Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), welche die Glukoneogenese reguliert, und die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), welche die Fettsäuresynthese mit NADPH versorgt, wurden auf mRNA-Ebene untersucht. Beide Enzyme zeigten keine Unterschiede in ihrer Expression zwischen Wildtyp und SNTB2 Knockout Tiere (Abbildung 54).

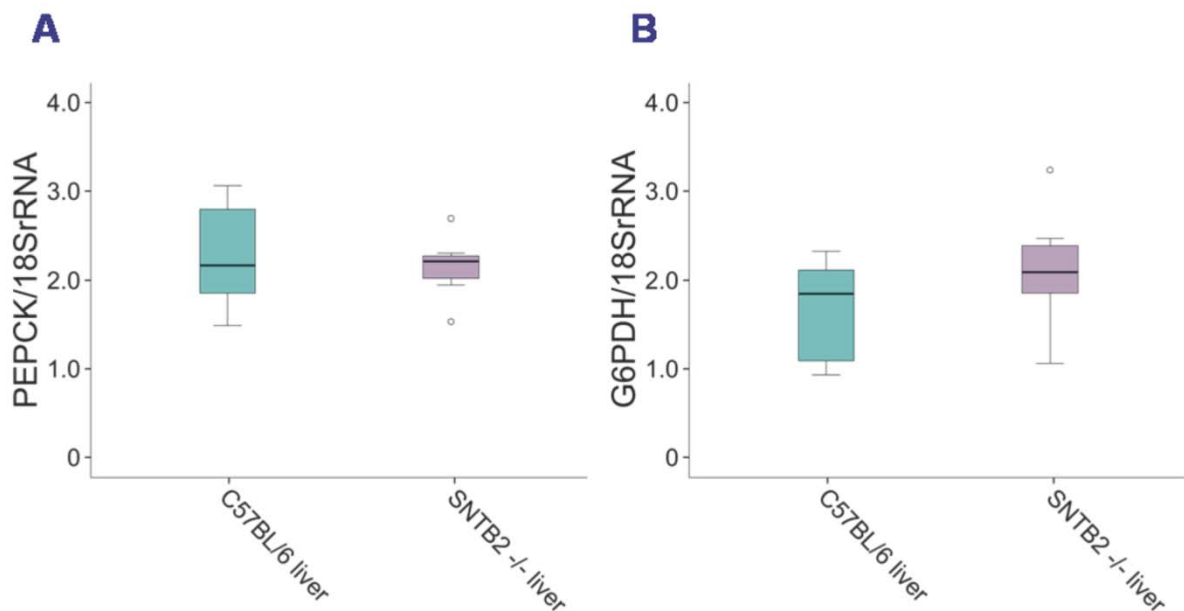


Abbildung 54: mRNA-Expressionsanalyse der PEPCK Expression (A) und der G6PDH Expression (B). Die 18S rRNA diente zur Normalisierung.

Der Glukose Transporter GLUT4 wurde untersucht. Ergebnisse der Westernblotanalysen zeigten eine minimale Erhöhung der Proteinmenge von GLUT4 in den Leberlysaten der SNTB2 -/- Mäuse (Abbildung 55). Die Glukoseserumwerte der SNTB2 -/- Mäuse waren zwar nicht unterschiedlich zu den Werten der Wildtypkontrollen, allerdings lies sich hier ebenfalls die Tendenz erkennen, dass die SNTB2 -/- Mäuse weniger Glukose im Serum aufwiesen.

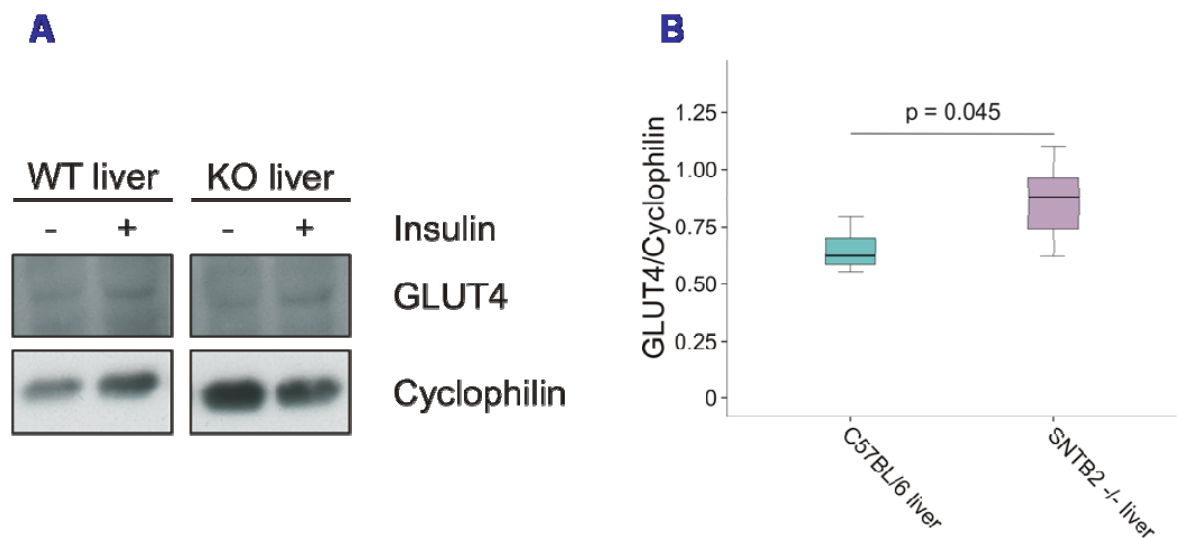


Abbildung 55: GLUT4 in Leberlysaten von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen.

(A) Immunoblotanalyse von GLUT4. Cyclophilin diente als Ladungskontrolle.

(B) Quantifizierung von GLUT4 in Leberlysaten aus 8 Wildtyp und 7 SNTB2 -/- Mäusen. Cyclophilin diente zur Normalisierung.

### 3.7.4.4 Entzündung und Fibrose in der Leber

Eine chronische Überernährung resultiert häufig in der Ausbildung von hypertrophen Adipozyten und ektopischer Speicherung von Lipiden in nicht-adipozytären Geweben, wie der Leber [36]. Diese Fettanhäufung ist nicht selten mit einem erhöhten Entzündungszustand der Leber assoziiert. mRNA-Analysen des proinflammatorischen Zytokins IL-6, des Makrophagenmarkers F4/80 und der Fibrosemarker  $\alpha$ Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA) und Kollagen Typ I alpha 1 (Col1A1) zeigten allerdings keine Unterschiede zwischen Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen (Tabelle 10). Der Grad der Fibrosierung war demzufolge in Wildtyp und SNTB2 -/- Tieren ähnlich.

	<b>C57BL/6</b>	<b>SNTB2 -/-</b>
Anzahl der Tiere	8	7
IL-6	0,037 (0,02 – 0,35)	0,037 (0,02 – 0,10)
F4/80	0,226 (0,16 – 0,47)	0,295 (0,14 – 0,43)
$\alpha$ SMA	0,036 (0,01 – 0,09)	0,035 (0,02 – 0,12)
Col1A1	0,060 (0,03 – 0,13)	0,053 (0,03 – 0,13)

Tabelle 10: mRNA-Analyse von IL-6, F4/80 und den Fibrosemarkern  $\alpha$ SMA und Col1A1 in Lebern aus Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen. Zur Normalisierung diente 18S rRNA.



Zur Verifizierung der Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen, wurde ferner die Fibrose mittels Sirius Red Färbung in den Leberschnitten sichtbar gemacht. In Abbildung 56 sind sowohl Schnitte von stärker verfetteter Leber dargestellt, als auch Schnitte von einer Leber die kaum eine Verfettung zeigte. In den Lebern der SNTB2 Knockout Mäuse waren nicht deutlich mehr fibrotische Bereiche zu erkennen als in ihren Wildtypkontrollen.

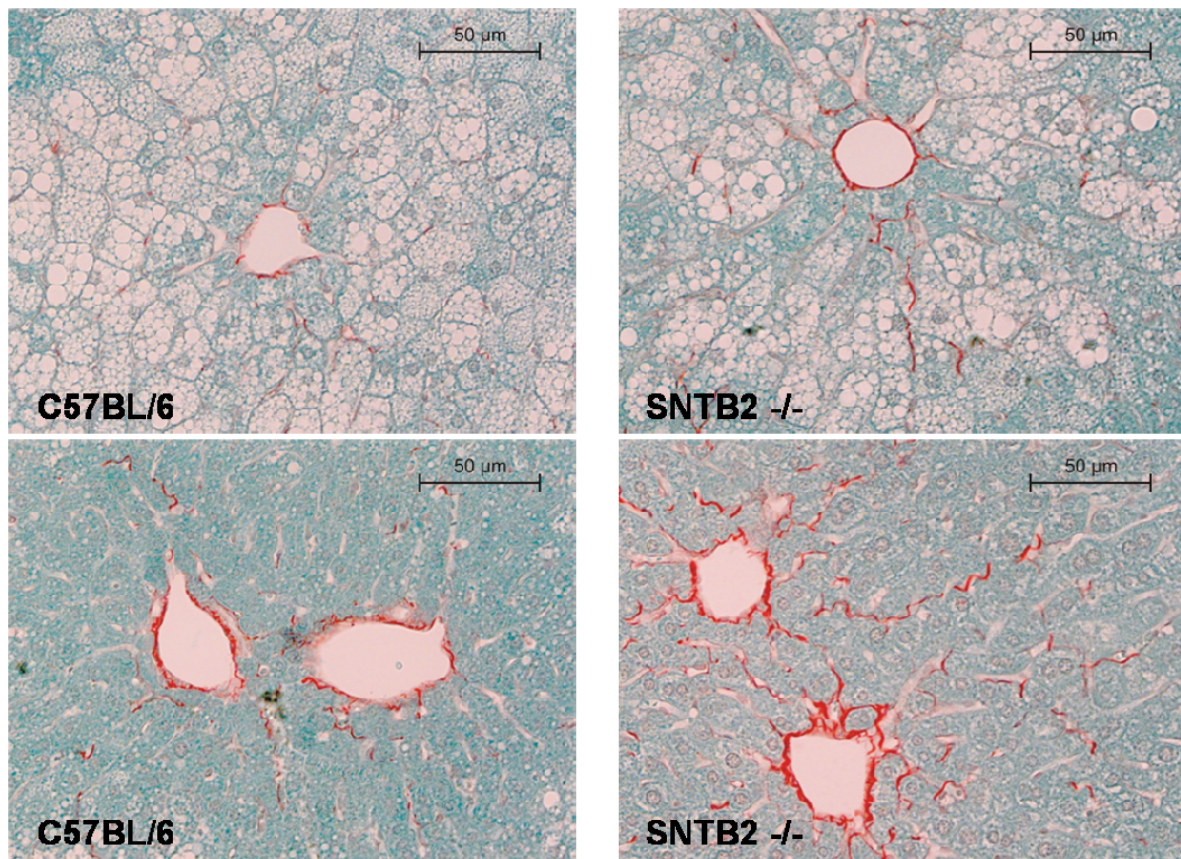


Abbildung 56: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sirius Red gefärbten Leberschnitten von Wildtyp und SNTB2 -/- Mäusen.

### 3.8 ob/ob Mäusen

Das Tiermodell der ob/ob Maus wird häufig für Untersuchungen der Pathogenese der Adipositas verwendet. Durch eine Mutation im Gen für Leptin leiden die Mäuse an Hyperphagie und Adipositas.

#### 3.8.1 Gewichtsunterschiede und Serumparameter

In Tabelle 11 ist der Gewichtsunterschied der ob/ob Mäuse zu ihren Wildtypkontrollen dargestellt. Das Körpergewicht der ob/ob Mäuse war doppelt so hoch wie das Gewicht der

Wildtyp Tiere. Die Werte der Serumlipide waren ebenfalls stark erhöht, sowie die Menge an Chemerin im Serum.

	<b>C57BL/6</b>	<b>ob/ob</b>	<b>p Value</b>
Anzahl der Tiere	5	5	
Körpergewicht [g]	23,21 (21,58 – 27,36)	51,63 (47,36 – 55,38)	p = 0.009
TG [mg/ml]	1,28 (1,22 – 1,31)	1,56 (1,50 – 2,59)	p = 0.009
Cholesterin [mg/dl]	53,12 (51,30 – 61,29)	107,14 (78,09 – 126,67)	p = 0.009
Chemerin [ng/ml]	41,08 (33,86 – 47,23)	66,56 (58,01 – 76,81)	p = 0.009

Tabelle 11: Untersuchung der ob/ob Mäuse und ihrer entsprechenden Wildtypkontrollen. Darstellung des Körpergewichts und der Serum-Triglyzeride (TG), -Gesamtcholesterin und -Chemerin.

### 3.8.2 Im Fettgewebe gespeicherte Lipide

Die gespeicherten Triglyzeride waren in den Fettgeweben der ob/ob Mäuse sehr stark erhöht, ebenso wie die Konzentration an Gesamtcholesterin deutlich induziert war. In Abbildung 57 sind die erhöhten Mengen an gespeicherten Lipiden eindeutig zu erkennen.

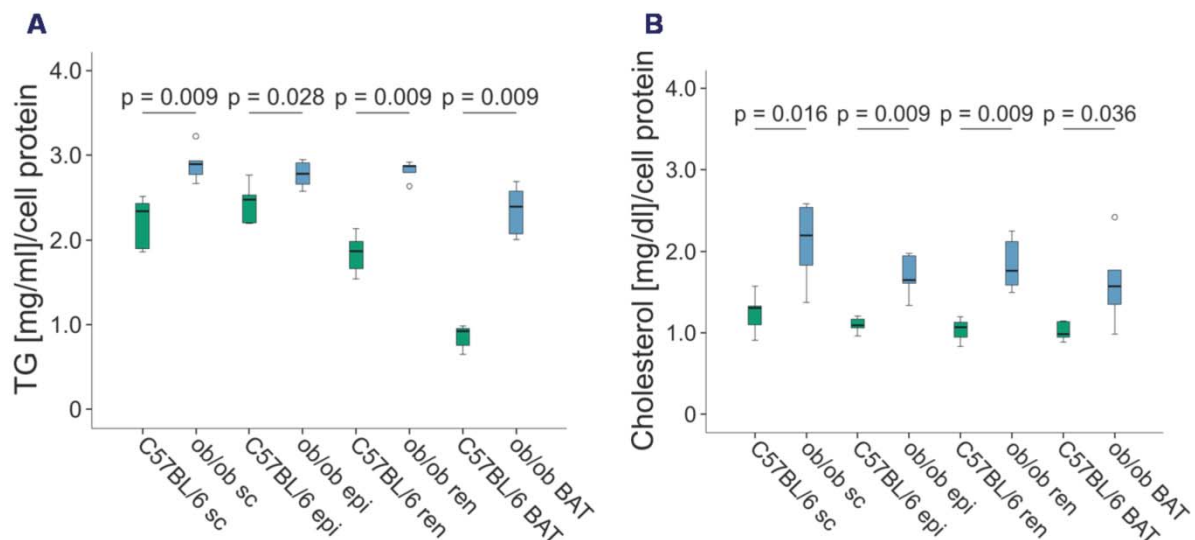


Abbildung 57: Konzentrationen an Triglyzeriden (A) und Gesamtcholesterin (B) in subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenalren (ren) und braunen (BAT) Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen, bezogen auf die Proteinmenge.

UCP-1 war im braunen Fett der Mäuse deutlich verringert (Abbildung 58).

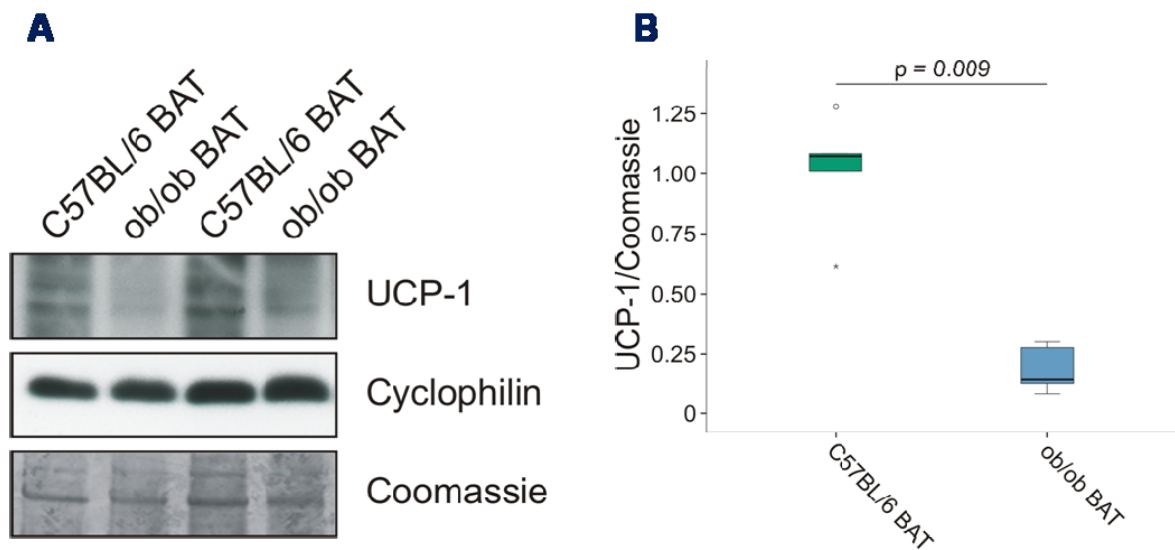


Abbildung 58: Analyse von UCP-1 in braunen Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen.

(A) Westernblot von UCP-1. Cyclophilin und die Coomassiefärbung dienten als Ladungskontrollen.

(B) Quantifizierung der Immunoblots beschrieben in A von jeweils 5 Wildtyp und ob/ob Mäusen. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

### 3.8.3 SNTB2 und Caveolin-1 im Fettgewebe

Untersuchungen der ob/ob Mäuse zeigten eine Erhöhung der Proteinexpression von SNTB2 in beinahe allen Fettdepots (Abbildung 59). Lediglich im braunen Fettgewebe zeigte die Vermessung der Westernblots keinen signifikanten Unterschied zu den Wildtypkontrollen (Abbildung 60).

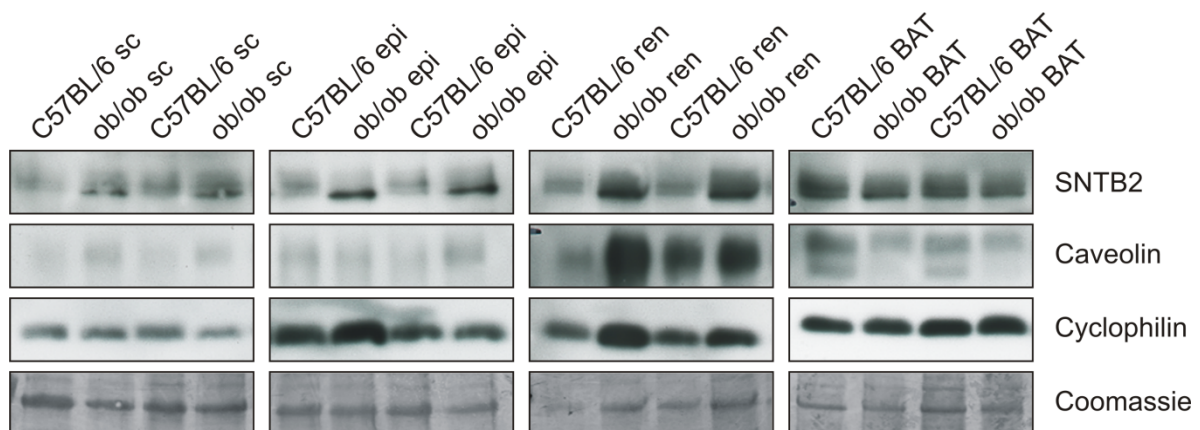


Abbildung 59: Westernblotanalyse von SNTB2 und Caveolin-1 in subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenen (ren) und braunen (BAT) Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen. Die Coomassiefärbung und Cyclophilin dienten als Ladungskontrollen.



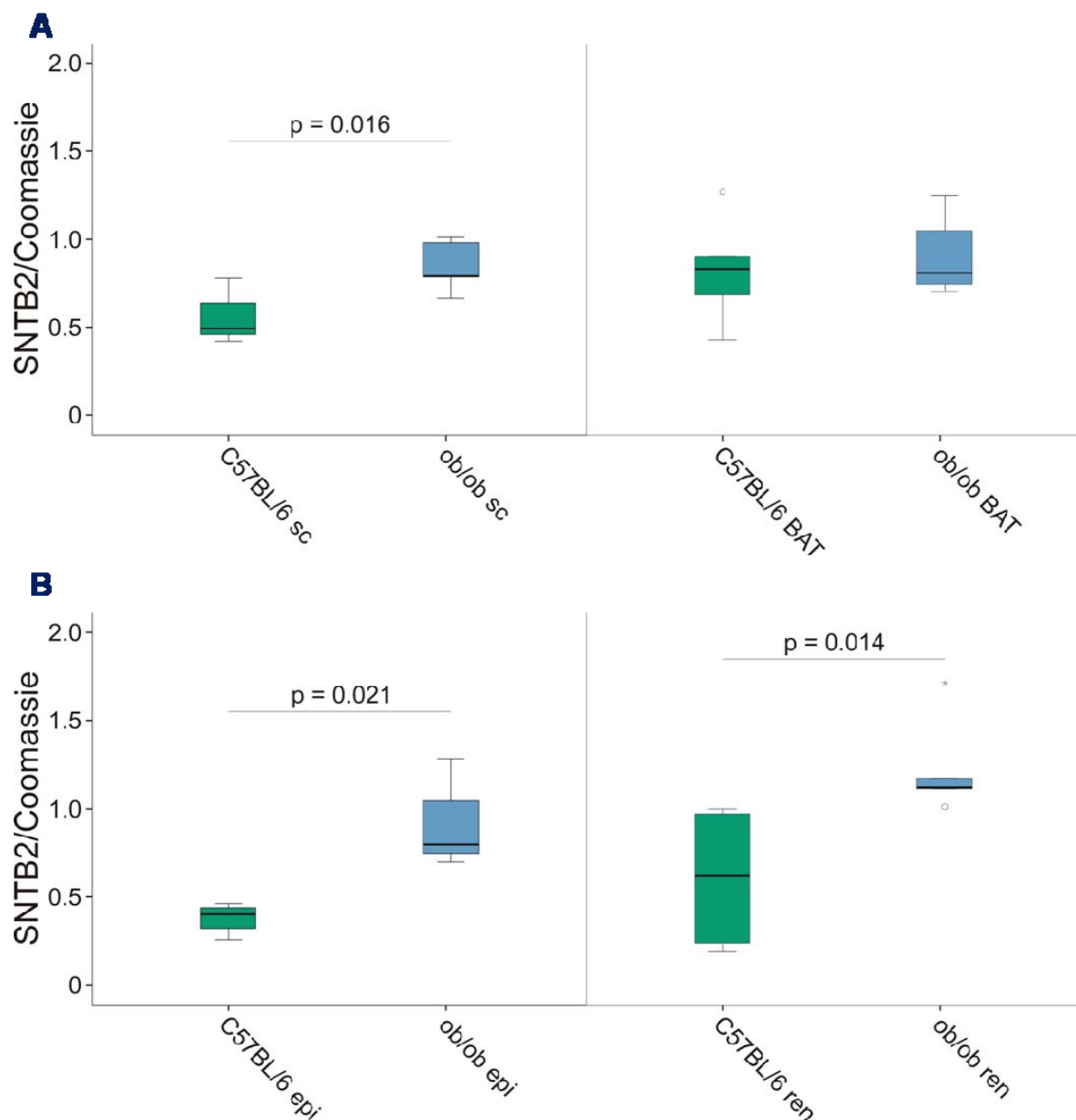


Abbildung 60 A, B: Quantifizierung der SNTB2 Immunoblots von subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenal (ren) und braunen (BAT) Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

Caveolin-1 zeigte, ähnlich wie SNTB2, eine Induktion der Proteinexpression in den subkutanen und den perirenal Fettdepots in den ob/ob Mäusen (Abbildung 61). In den epididymalen und braunen Fettgeweben zeigte sich nur eine leicht ansteigende Tendenz der Caveolin-1 Expression.

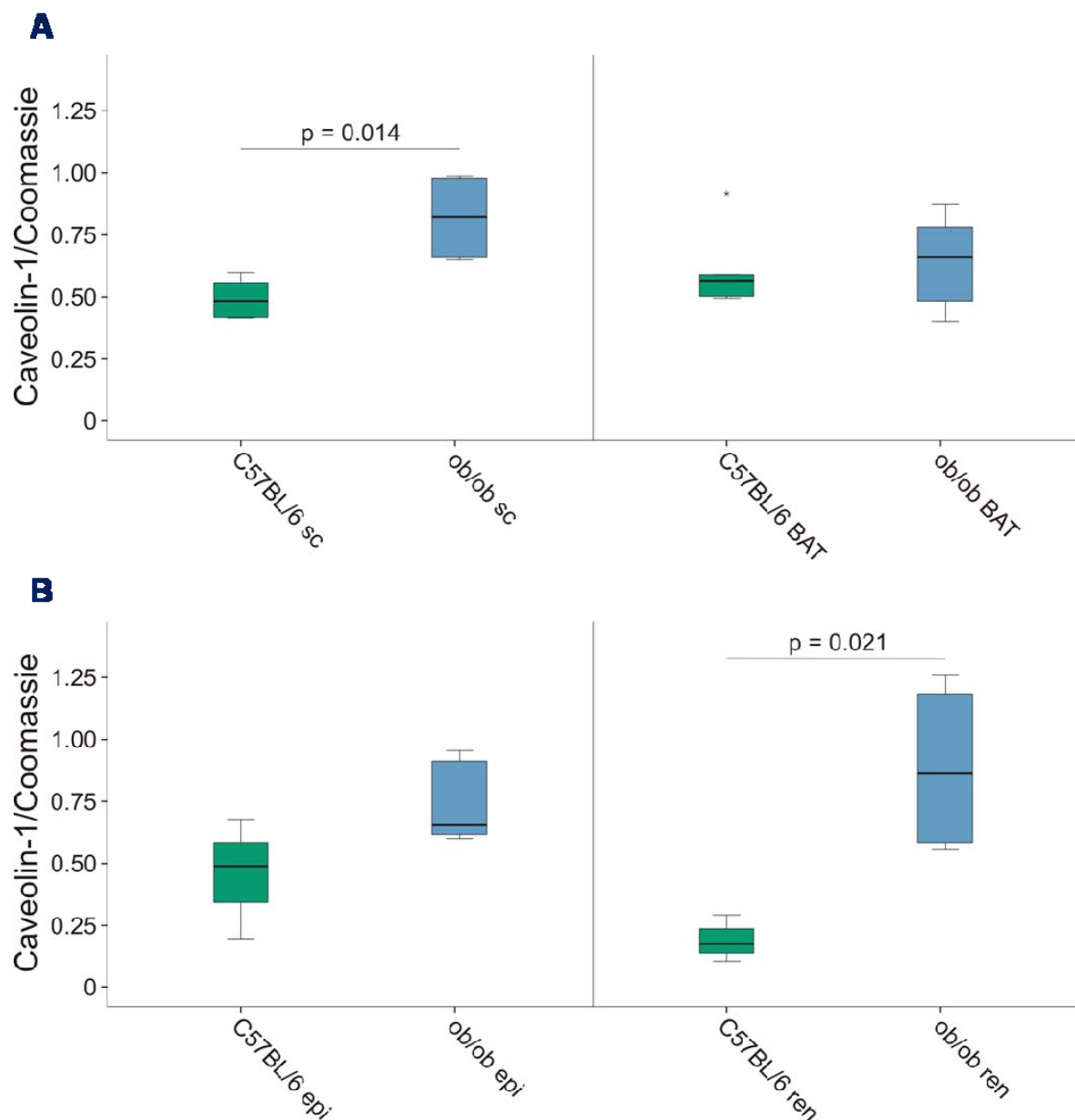


Abbildung 61: Quantifizierung der Caveolin-1 Immunoblots von subkutanen (sc), epididymalen (epi), perirenal (ren) und braunen (BAT) Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

Zur Prüfung der Ergebnisse der Immunoblotanalysen, wurden die Fettdepots der ob/ob Mäuse auf mRNA-Ebene untersucht. Ähnlich der Resultate der Westernblotexperimente zeigte sich in allen Fettdepots der ob/ob Mäuse eine ausgeprägte Erhöhung der SNTB2 Expression (Abbildung 62).

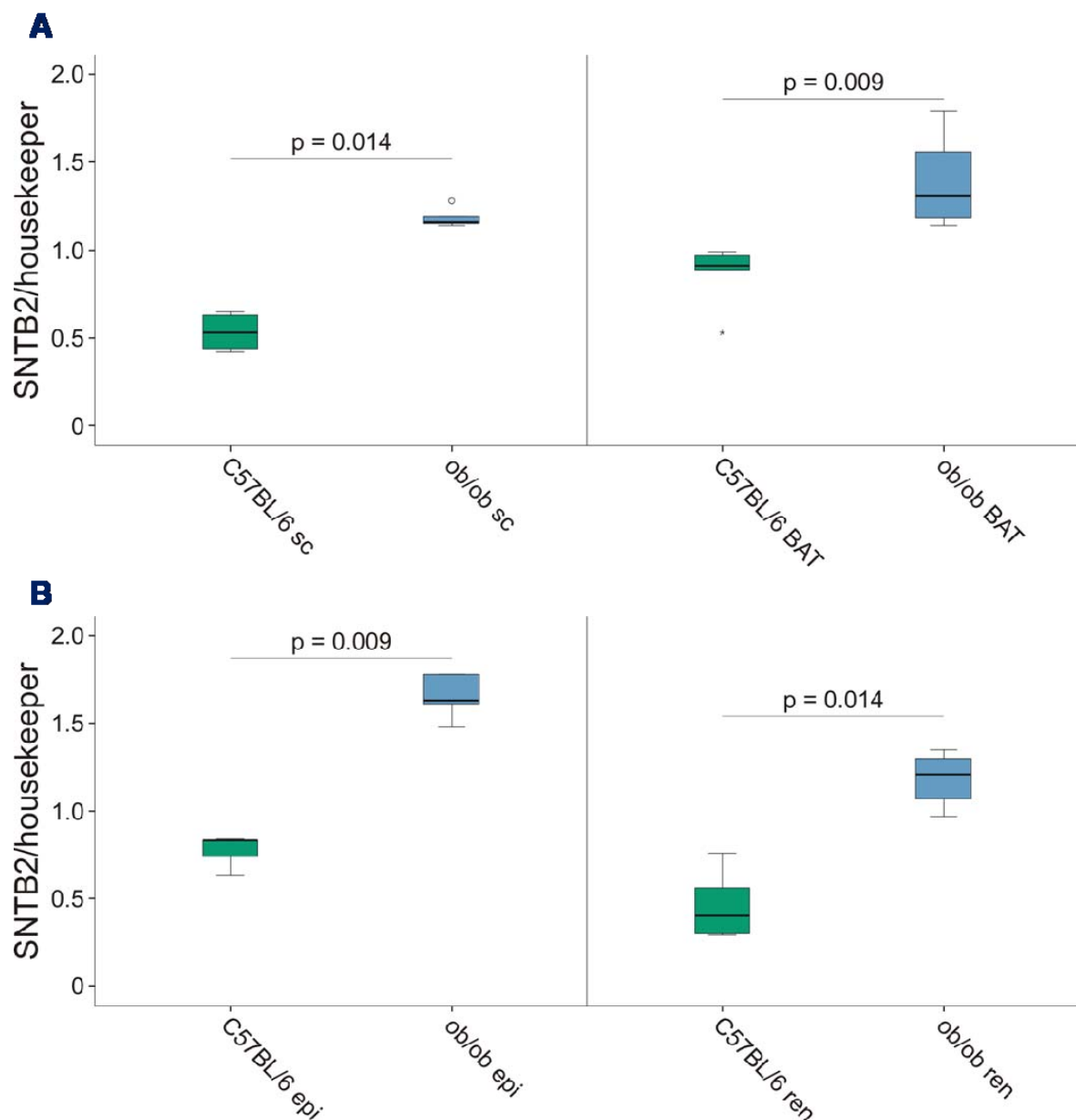


Abbildung 62: SNTB2 mRNA-Expression in subkutanen (sc) und braunen (BAT) (A) und epididymalen (epi) und perirenen (ren) (B) Fettgeweben von Wildtyp und ob/ob Mäusen. Der Mittelwert aus 18S rRNA und Cyclophilin diente zur Normalisierung.

SNTB2 ist folglich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den Fettdepots der ob/ob Mäuse induziert.

### 3.8.4 Analyse der Lebern der ob/ob Mäuse

Neben den erhöhten Mengen an gespeicherten Lipiden in den Fettdepots der ob/ob Mäuse, zeigte auch die Leber vermehrte Mengen intrazellulärer Triglyzeride (Abbildung 63 A) und Cholesterin (Abbildung 63 B).

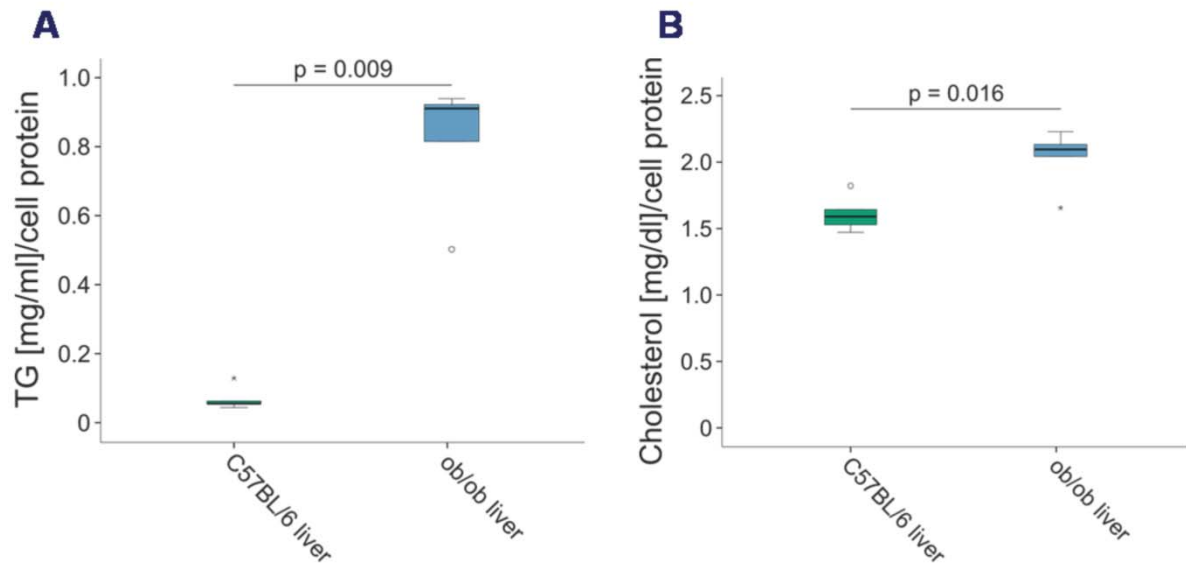


Abbildung 63: Triglyzerid- (A) und Gesamtcholesteringehalt (B) in Leberlysaten von Wildtyp und ob/ob Mäusen, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration.

Untersuchungen der SNTB2 Expression in den Lebern der ob/ob Mäuse zeigten auf Proteinebene (Abbildung 64 A und C) und auf mRNA-Ebene (Abbildung 64 B) eine Induktion von SNTB2. Caveolin-1 war im Gegensatz hierzu nicht verändert (Abbildung 64 D).

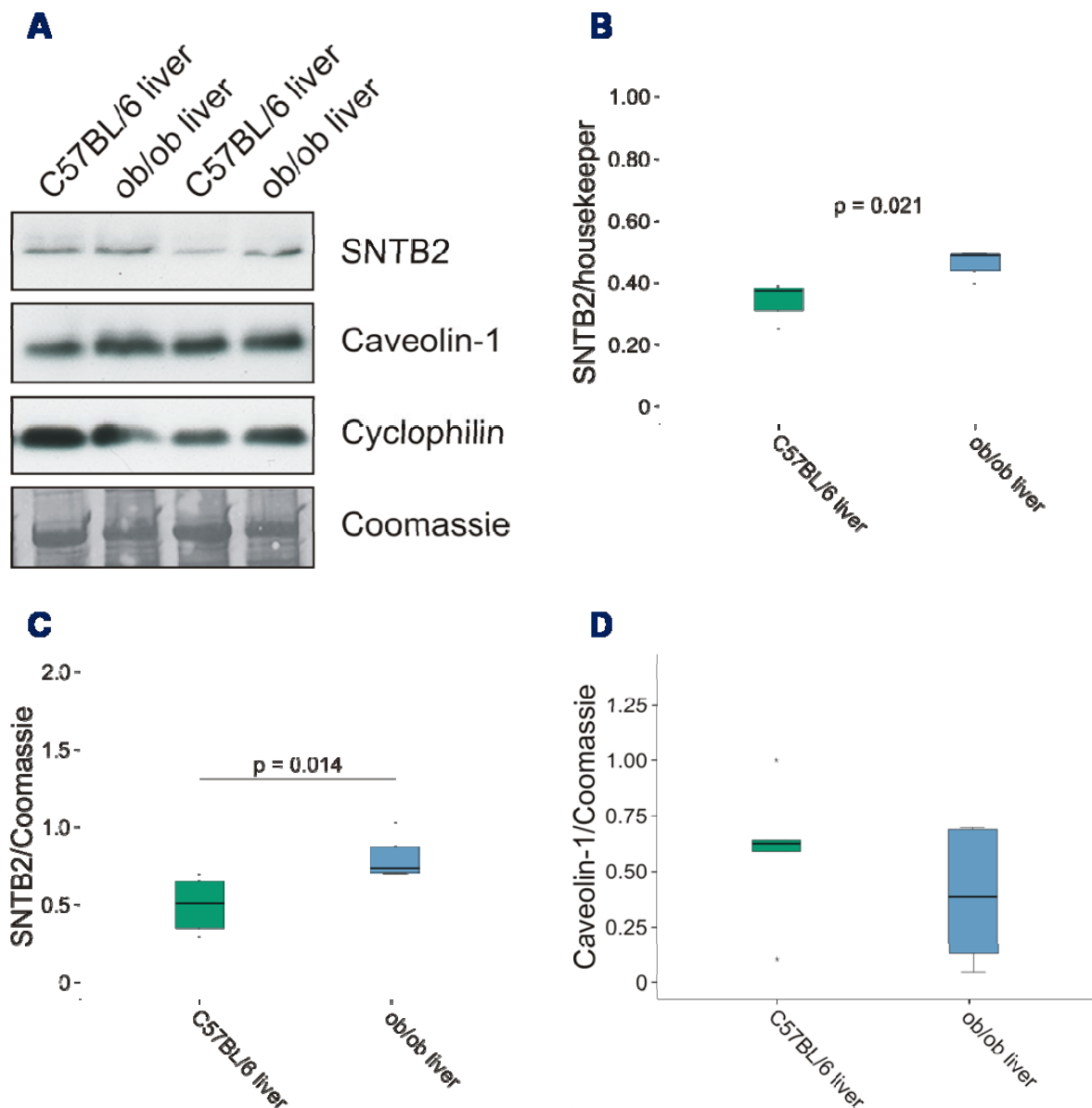


Abbildung 64: SNTB2 und Caveolin-1 in Leberlysaten von Wildtyp und ob/ob Mäusen.

(A) Immunoblotanalysen von SNTB2 und Caveolin-1. Als Beladungskontrolle dienten Cyclophilin und die Coomassiefärbung.

(B) mRNA-Expressionsanalyse von SNTB2 in den Lebern. Der Mittelwert aus 18S rRNA und Cyclophilin diente zur Normalisierung.

(C) Quantifizierung der SNTB2 Westernblotexperimente. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

(D) Quantifizierung der Caveolin-1 Westernblotexperimente. Die Coomassiefärbung diente zur Normalisierung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression und Lokalisation von SNTB2 in Fibroblasten und Adipozyten

SNTB2 wurde bisher vorrangig im Muskel untersucht [62, 66]. Frühere Beobachtungen aus meiner Diplomarbeit und auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten für SNTB2 eine starke Expression in Adipozyten. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von SNTB2 in Adipozyten geklärt werden. In der Zelllinie 3T3-L1 war SNTB2 in reifen Adipozyten ca. 3,5 fach höher auf Proteinebene exprimiert als in den Fibroblasten. Der Vergleich verschiedener Gewebe in der Maus zeigte, dass SNTB2 vor allem in den weißen Fettdepots exprimiert wurde. Da das Fettgewebe eine funktionelle Einheit aus verschiedensten Zelltypen darstellt [93], wurden die nicht-adipozytären Zellen der stroma-vaskulären Zellfraktion gesondert untersucht. Im Fettgewebe war SNTB2 primär in den Adipozyten zu finden, während es in den Zellen der stroma-vaskulären Fraktion kaum detektiert werden konnte. In reifen Adipozyten füllen die eingelagerten Lipide in Form von Lipidtropfen nahezu den gesamten Zellraum aus und drängen somit das Zytoplasma und den Zellkern an die Zellperipherie [94]. SNTB2 war mittels Immunfluoreszenzfärbung in reifen Adipozyten verteilt im Zytoplasma zu finden. Für detailliertere Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von SNTB2 eigneten sich die 3T3-L1 Fibroblasten.

Immunfluoreszenzfärbungen in 3T3-L1 Fibroblasten zeigten, dass SNTB2 im Zytoplasma lokalisiert war und hier vesikelförmige und filamentartige Strukturen ausbildete. Eine Beteiligung von SNTB2 am vesikulären Transport wurde bereits beschrieben. In der pankreatischen  $\beta$ -Zelle ist SNTB2 an der Exozytose von sekretorischen Granula beteiligt [69, 72-73], wodurch die Insulinfreisetzung reguliert wird. Dies geschieht über die Bindung des SNTB2-Utrophin-Komplexes an ICA512, die über die Phosphorylierung von SNTB2 reguliert wird. In Adipozyten wurde gezeigt, dass GLUT4 über Exozytose an die Plasmamembran gelangt. Allerdings wurden bisher keine für diese Vesikel spezifischen Proteine beschrieben, so dass nicht geklärt werden konnte, ob SNTB2 mit Vesikeln, die an der Exozytose beteiligt sind, interagiert.

Frühe Endosomen vermitteln den Transport von über Endozytose aufgenommenen Substanzen zu späten Endosomen und Lysosomen oder deren Rücktransport zur Plasmamembran. Early Endosome Antigen1 (EEA1) ist ein spezifischer Marker dieser frühen Endosomen [95-96]. Immunfluoreszenzfärbungen von EEA1 in 3T3-L1 Fibroblasten zeigten

vesikuläre Strukturen auf, allerdings fand sich keine Überlagerung der Färbungen von SNTB2 und EEA1.

Als spezifischen Organellmarker der Lysosomen wurde LAMP1 verwendet [97]. Hier zeigte sich wiederum keine Kolo-kalisation mit SNTB2. Auch die Kofärbung von SNTB2 mit SOD2 zeigte keinerlei Überlagerung. SOD2 ist ein Protein der mitochondrialen Matrix und katalysiert die Disproportionierung von Superoxid-Anionen.

Ferner wurde wegen der labyrinth-ähnlichen Struktur der SNTB2 Färbung auch eine mögliche Kolo-kalisation von SNTB2 mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) eruiert. Das ER ist ein stark verzweigtes tubuläres Membransystem, welches das glatte und in Verbindung mit den Ribosomen, das rauhe ER ausbildet. Die am rauhen ER neu synthetisierten Proteine werden im Lumen modifiziert und gefaltet. Vom glatten ER aus werden diese Proteine zum Intermediärkompartiment transportiert [98]. Mittels ER-Tracker konnte das ER in den Fibroblasten sichtbar gemacht werden. Die Überlagerung der Einzelfärbung lies allerdings nicht auf eine Kolo-kalisation mit SNTB2 schließen.

Immunfluoreszenzfärbungen von SNTB2 ließen ebenso filamentartige Strukturen deutlich werden. Da SNTB2 über Utrophin an das Actinzytoskelett binden könnte [99] wurde auch eine mögliche Kolo-kalisation mit  $\beta$ Actin untersucht. Es konnte jedoch keine Kolo-kalisation von SNTB2 mit den Actinfilamenten nachgewiesen werden. Auch die durch den Actinantikörper angefärbten punktförmigen Strukturen, welche die ausgebildeten Quervernetzungen der Filamente darstellen könnten [100], waren SNTB2 nicht benachbart. Eben-sowenig fand sich eine vollständige Überlagerung mit der  $\alpha$ Tubulinfärbung, das Protein der Mikrotubuli. Zwar deutete die Gelbfärbung nach Überlagerung auf eine Kolo-kalisation hin, jedoch bildeten SNTB2 und  $\alpha$ Tubulin unterschiedliche Strukturen aus.

Es konnte also nicht geklärt werden, welchen zellulären Strukturen die mit dem SNTB2 Antikörper gefärbten Vesikel zuzuordnen sind. Die teilweise nachgewiesene Kolo-kalisation von SNTB2 mit Tubulin bzw. Actin könnte bedeuten, dass nur eine Subpopulation von SNTB2 Molekülen mit dem Zytoskelett assoziiert ist.

Es ist darüber hinaus bekannt, dass SNTB2 mit sogenannten Stressfasern interagieren kann [101-102]. Immunfluoreszenzfärbungen der Stressfasern könnten über eine Interaktion Aufschluss geben und die Rolle von SNTB2 in Bezug auf die Zellmotilität beleuchten.

## **4.2 Die Rolle von SNTB2 für die Funktionalität von Adipozyten**

### **4.2.1 Adipozytenhypertrophie und Hyperplasie**

Das Fettgewebe stellt ein heterogenes Organ dar, das über den ganzen Körper verteilt ist und sich zudem aus verschiedenen Zellen zusammensetzt. Neben reifen Adipozyten und Präadipozyten finden sich auch nicht-adipozytäre Zellen, wie Bindegewebszellen, Blutgefäße, Nervenfasern und Zellen des Immunsystems wieder [50, 103]. Das Fettgewebe unterliegt ständigen Veränderungen, wie der Expansion des Fettgewebes und Erneuerung der Fettzellen [1-2]. Um dies zu gewährleisten können proliferierende Vorläuferzellen zu reifen Adipozyten differenzieren [3-4].

In den noch teilungsfähigen 3T3-L1 Fibroblasten hatte der Knockdown von SNTB2 eine Verminderung der Proliferation der Zellen zur Folge. Die dieser Beobachtung zu Grunde liegenden Mechanismen wurden bisher nicht untersucht, eine erhöhte Letalität konnte jedoch ausgeschlossen werden. Geht man davon aus, dass diese in vitro Beobachtung in vivo relevant sein könnte, würde man eine verminderte Zahl von Präadipozyten und möglicherweise reifen Adipozyten in den Fettgeweben der SNTB2 defizienten Mäuse erwarten. Tatsächlich hatten die Mäuse nach 24-wöchiger Hochfettdiät deutlich kleinere Fettdepots als ihre Wildtypkontrolle. Da die Adipozyten im subkutanen und perirenal Fettgewebe größer und im epididymalen Fett ähnlich groß wie die Adipozyten der Wildtyptiere waren, lässt sich hieraus schließen, dass die SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse weniger Adipozyten besitzen als die Wildtyp Tiere. Ein vermindertes Proliferationspotential der Fibroblasten könnte eine Erklärung für die reduzierte Anzahl an Adipozyten darstellen.

### **4.2.2 Metabolische Konsequenzen der Adipozytenhypertrophie**

Die vermehrte Fettmasse in der Adipositas resultiert aus dem erhöhten Bedarf für die adipozytäre Lipidspeicherung und geht mit einer Vergrößerung der Zellvolumina (Hypertrophie) und einer Vermehrung der Zellzahl (Hyperplasie) einher. In der Adipositas exprimieren die Adipozyten verstärkt das Chemokin CCL2 welches das Einwandern von Blutmonozyten in das Fettgewebe stimuliert. Dieser und andere Mechanismen führen schließlich zu einem chronischen Entzündungsstatus, Hypoxie und phänotypischen Veränderungen der zellulären Komponenten des Fettgewebes [104].



In Abbildung 65 sind die Veränderungen in der Adipositas dargestellt, mit Zunahme der Adipozytenvolumina, anschließender Hyperplasie und Akkumulation von Makrophagen, die zur Entzündung beitragen [105-106].

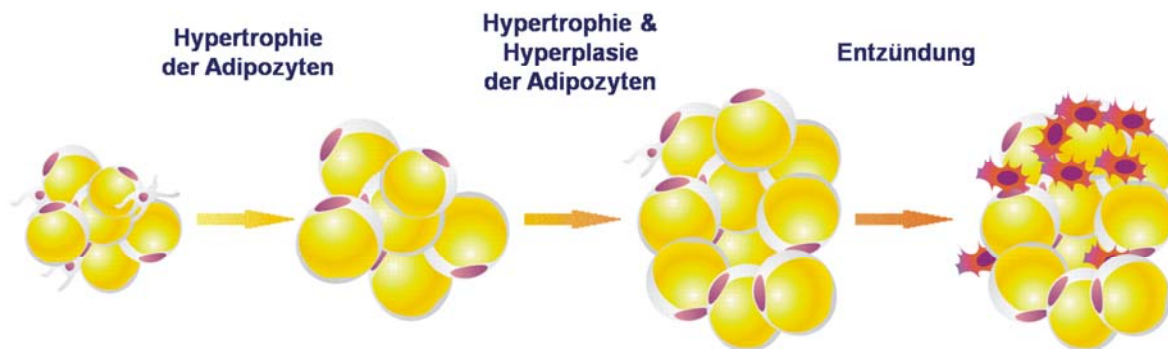


Abbildung 65: Modell der Veränderungen des Fettgewebes in der Adipositas [105].

Im Fettgewebe der SNTB2 defizienten Mäuse zeigte sich aber eine verringerte Adipozytenzahl bei gleichzeitiger Adipozytenhypertrophie. Diese war allerdings nicht, wie erwartet [107-108], mit einer Erhöhung der Entzündung in den Fettdepots der Tiere assoziiert. Weder die Expression proinflammatorischer Zytokine, noch die IL-6 Freisetzung der Fettgewebeskulturen zeigten Unterschiede zu den Wildtyp Tieren auf. Dies könnte bedeuten, dass die Adipozytenhypertrophie per se nicht für die erhöhte Entzündung in der Adipositas verantwortlich ist. Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse von GeneChip Experimenten, mit deren Hilfe die Genexpression im subkutanen Fett von Wildtyp und SNTB2 defizienten Mäusen untersucht wurde, untermauert. Mit diesem Ansatz konnte keine erhöhte mRNA Expression von Zytokinen oder Chemokinen in den gentechnisch veränderten Tieren festgestellt werden (eigene vorläufige Daten).

Die Serumspiegel der Triglyzeride und freien Fettsäuren waren in den nüchternen SNTB2  $-/-$  Tieren ebenfalls nicht verändert. Im Normalfall geht die Hypertrophie der Adipozyten mit einer Erhöhung der Lipolyseaktivität einher [109]. Dies war in den SNTB2  $-/-$  Mäusen nicht zu beobachten, die Mengen an freiem Glyzerin in den Seren der SNTB2  $-/-$  Mäusen waren sogar vermindert. Postprandial wurden die freien Fettsäuren sogar schneller aus dem Serum der SNTB2 defizienten Tiere entfernt. Diese Beobachtungen und die Ergebnisse der in vitro Versuche in den 3T3-L1 Zellen mit SNTB2 Knockdown, die trotz der größeren Lipidtropfen weiter in der Lage waren zusätzliche Triglyzeride zu speichern, weisen darauf hin, dass die Hypertrophie zumindest in diesem Tiemodell nicht mit einer gestörten Lipidspeicherung im Fett einherging. Ferner war die Proteinexpression der Lipidtropfen-assoziierten Proteine, der

lipogenen Enzyme und der Lipasen im Fettgewebe der SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse nicht verändert. Eine inadäquate Fettspeicherung der Adipozyten bewirkt deren Ablagerung in peripheren Organen [36]. In den Lebern der SNTB2 <sup>-/-</sup> Tieren waren allerdings geringere Mengen an zellulären Triglyzeriden zu finden.

Diese Ergebnisse würden für einen erhöhten Stoffwechsel der SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse sprechen. Untersuchungen der Mäuse im metabolischen Käfig, die wir leider vor Ort nicht durchführen können, würden Aufschluss über die Stoffwechselrate geben.

#### **4.2.3 Regulation der Cholesterinhomeostase**

Obwohl das Fettgewebe den größten Speicher für freies Cholesterin darstellt, ist die endogene Cholesterinsynthese der Adipozyten gering. Das zelluläre Cholesterin stammt primär aus der Aufnahme zirkulierender Lipoproteine [59, 110]. Um die Cholesterinhomeostase aufrecht zu erhalten, gibt es in Adipozyten verschiedenste Wege den Cholesterin Efflux zu regulieren. ABCA1 vermittelt den Efflux von Cholesterin und kann über seinen C-Terminus mit dem SNTB2-Utrophin-Komplex interagieren [63]. Die endogenen Cholesterinkonzentrationen waren im subkutanen und renalen Fett nicht verändert und im epididymalen Fettgewebe und der Leber erhöht. Obwohl dies theoretisch auf eine verminderte Aktivität von ABCA1 in den Geweben mit einer erhöhten Cholesterinmenge hindeuten könnte, konnte dies experimentell nicht bestätigt werden. In Fibroblasten hatte der Knockdown von SNTB2 keine signifikante Veränderung des Cholesterineffluxes bewirkt [111]. Weiterhin wird weder in den Fibroblasten noch in den Adipozyten eine geringere ABCA1 Proteinexpression nach SNTB2 Knockdown beobachtet. ABCA1 war im subkutanen Fett sogar höher exprimiert. Daher ist eine gestörte ABCA1 Funktion in den SNTB2 defizienten Zellen unwahrscheinlich.

Ob die im epididymalen Fettgewebe und der Leber erhöhten Cholesterinkonzentrationen durch eine erhöhte VLDL- bzw. LDL-vermittelte Cholesterinaufnahme, durch eine erhöhte endogene Synthese, oder im Falle der Leber durch eine verringerte Freisetzung von Cholesterin in den Lipoproteinen bzw. Ausscheidung in Form von Gallensäuren als Folge der Defizienz von SNTB2 zu erklären ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Verringerung des Cholesterins im Serum der SNTB2 <sup>-/-</sup> Tiere deutet auf eine verminderte hepatische Freisetzung bzw. erhöhte Elimination dieses Lipids hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Synthese von Cholesterin, die über den Transkriptionsfaktor SREBP2 reguliert wird, erhöht ist. Bei reduzierten endogenen Cholesterinkonzentrationen wird über proteolytische Spaltung SREBP2 aktiviert und

induziert in Folge dessen die HMG-CoA Reduktase und den LDL-Rezeptor um die Cholesterinsynthese bzw. -aufnahme zu erhöhen [56, 59]. Es wurde lediglich im subkutanen Fettdepot der SNTB2 -/- Mäuse vermehrt aktives SREBP2 auf Proteinebene nachgewiesen.

#### **4.2.4 SNTB2 beeinflusst die Adipogenese**

Adipozyten speichern Lipide in metabolisch sicherer Form in den Lipidtropfen. Die Triglyzeridspeicherung in den Adipozyten wird durch die Bilanz zwischen Aufnahme und Freisetzung von freien Fettsäuren bestimmt [112]. In den SNTB2 defizienten Mäusen waren die Adipozyten des Fettgewebes hypertroph, speicherten subkutan geringere Mengen an Triglyzeriden und hatten im epididymalen Fettdepot erhöhte Cholesterinkonzentrationen. Wurden hingegen 3T3-L1 Zellen als Präadipozyten transfiziert und differenziert, so bildeten die Adipozyten analog zu den in vivo Beobachtungen große Lipidtropfen aus. Diese Zellen zeichnen sich durch geringere intrazelluläre Triglyzeride und Cholesterin aus. Der Vergleich zwischen den in vitro und den in vivo Versuchen macht deutlich, dass die Veränderungen des Gesamtcholesteringehalts offensichtlich kein direkter Effekt der SNTB2 Expression ist. Die Ausbildung großer Lipidtropfen und die verringerte Speicherung an Triglyzeriden könnten hingegen direkte Effekte des Knockouts bzw. Knockdowns von SNTB2 sein. In Drosophila konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Enzymen der Fettsäure- und der Cholesterinsynthese ebenfalls die Ausbildung von größeren Lipidtropfen zur Folge hatte [75]. Allerdings führte der Knockdown von FAS zu einer Inhibition der Adipogenese, sodass sich kaum Lipidtropfen in den 3T3-L1 Adipozyten ausbilden konnten. Dieser Effekt des Knockdowns von FAS wurde bereits in der Literatur beschrieben [113]. Hingegen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine durch Lovastatin Behandlung erzielte Depletion von Cholesterin die Ausbildung großer Lipidtropfen zur Folge hatte. Die Verminderung der zellulären Cholesterinkonzentration führte zur Aktivierung von SREBP2, während die Proteinexpressionen von SNTB2 und Caveolin-1 vermindert waren. Eine gleichzeitige Inkubation mit Mevalonat konnte den Effekt von Lovastatin wieder aufheben. In einer kürzlich von uns veröffentlichten Arbeit konnten wir zeigen, dass aktives SREBP2 in hypertrophen Adipozyten erhöht vorkommt [56]. In den 3T3-L1 Zellen führte der Knockdown von SREBP2 zwar zu einer Verminderung der Cholesterinkonzentrationen, allerdings konnte kein Effekt auf die Proteinexpression von SNTB2 beobachtet werden.

Um die Effekte des Knockdown von SNTB2 während der Adipogenese von der direkten Wirkung in den reifen Zellen unterscheiden zu können, wurde der Knockdown von SNTB2

auch in bereits differenzierten Adipozyten durchgeführt. Wurden die 3T3-L1 Zellen als Präadipozyten transfiziert und differenziert, so bildeten die Adipozyten große Lipidtropfen aus. Dies konnte in den Zellen, welche im bereits differenzierten Status transfiziert wurden, nicht beobachtet werden. Diese Zellen unterschieden sich morphologisch nicht von den Kontrollzellen und speicherten auch vergleichbar hohe Triglyzeridmengen. Die Folgen des Knockdown direkt auf die Adipozyten waren somit nicht mit den Auswirkungen auf die Adipogenese zu vergleichen. *SNTB2* scheint folglich auf die Bildung und Fusion der Lipidtropfen während der Differenzierung einen wichtigen Einfluss zu haben. Haben sich die Lipidtropfen bereits ausgebildet konnten keine morphologischen Veränderungen der Zellen als Folge des Knockdowns beobachtet werden.

Die gegenwärtig akzeptierte Hypothese der Lipidtropfenbildung beschreibt, dass die Lipidtropfen aus dem ER stammen und durch Verschmelzung von neutralen Lipiden zu lamellären Schichten innerhalb des Bilayers des ERs entstehen [24, 114]. Die Größe der Lipidtropfen kann zum Beispiel durch die Fusion einzelner Tropfen reguliert werden. In den *in vitro* Versuchen, sowohl in der murinen Fibroblastenzelllinie als auch in isolierten primären Präadipozyten, welche zu reifen Adipozyten differenziert werden, bilden die Adipozyten stets mehrere Lipidtropfen aus. Dies könnte dafür sprechen, dass diese *in vitro* gereiften Zellen nicht enddifferenziert sind, da *in vivo* das weiße Fettgewebe im Normalfall aus univakulären Fettzellen besteht, welche sich als Adipozyten mit einer großen Fettvakuole, einem randständigen Zellkern und einem schmalen peripher gelegenen Zytoplasma darstellen ([115] und eigene Beobachtungen). In jungen Mäusen hingegen finden sich neben den univakulären auch multivakuläre Adipozyten [115], welche vermutlich im Laufe der Zeit zu einer großen Vakuole fusionieren. Der *SNTB2* Knockdown könnte zu einer vermehrten Fusion der Lipidtropfen führen, sodass sich nur wenige, dafür deutlich größere Lipidtropfen in den Zellen darstellen. Die Größe der Lipidtropfen scheint somit nicht allein durch den zellulären Triglyzeridgehalt bestimmt zu werden, da die 3T3-L1 Adipozyten trotz geringerer intrazellulärer Triglyzeridmengen große Lipidtropfen ausbilden (Abbildung 66). Immunoblotanalysen zeigten, dass verschiedene Lipasen nicht auf Proteinebene durch den Knockdown von *SNTB2* reguliert waren. Die basale Lipolyseaktivität unterschied sich zudem sowohl in den als Präadipozyten transfizierten und anschließend differenzierten Zellen, als auch in den bereits als ausdifferenzierte Adipozyten transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht. Die induzierte Lipolyse war allerdings in den Zellen, welche während der Differenzierung transfiziert wurden, erhöht, sodass dies eine mögliche Erklärung für die geringeren Triglyzeridmengen sein könnte. Die Speicherung von Lipiden in den Zellen schien

hingegen nicht durch den Knockdown beeinflusst zu sein. Der Zeitpunkt des Knockdowns war hier nicht entscheidend. Die Inkubation der Zellen mit Fettsäuren für 24 h resultierte in erhöhten intrazellulären Triglyzeridmengen und induzierter Proteinexpression des für den Transport und die Aufnahme zuständigen Proteins FABP4 [116]. Somit kann man festhalten, dass trotz der Ausbildung großer Tropfen die Zellen mit SNTB2 Knockdown noch zusätzliche Triglyzeride einlagern konnten, wie die Stimulationsversuche mit freien Fettsäuren aufzeigten.

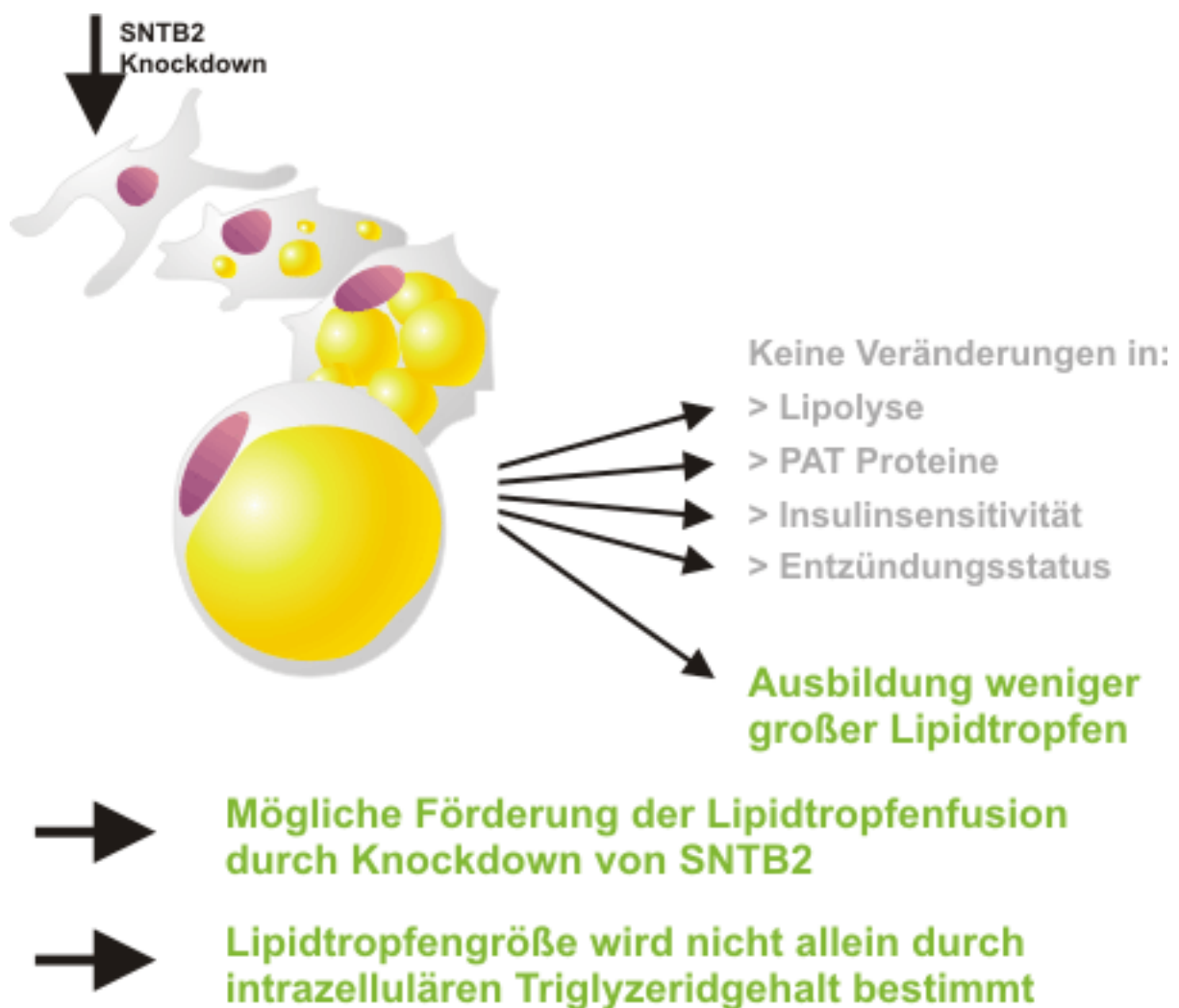


Abbildung 66: Knockdown von SNTB2 in Präadipozyten mit anschließender Differenzierung und den Folgen des Knockdowns. PAT, Lipidtropfen-assoziierte Protein der Perilipin-Adipophilin-TIP47 Familie.

#### 4.3 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SNTB2

SNTB2 stellt ein Adapterprotein dar, dessen Funktion in Adipozyten durch Untersuchungen der Interaktionspartner geklärt werden könnte. Zur Identifizierung der Interaktionspartner von

SNTB2 wurden Koimmunpräzipitationsversuche durchgeführt, in denen die bereits bekannte Interaktion von SNTB2 mit Utrophin nun auch in Adipozyten nachgewiesen werden konnte [63, 71]. Zusätzlich ergab sich eine Bindung zwischen Caveolin-1 und SNTB2. In einigen Publikationen wird eine Interaktion von  $\alpha$ -Syntrophin mit Caveolin-3, der muskelspezifischen Caveolin Form, beschrieben [117-118]. Hier wird die Interaktion über die gemeinsame Bindung an die Stickstoffmonoxid-Synthase ermöglicht. Im Falle von SNTB2 und Caveolin-1 ist allerdings nicht bekannt, ob ein weiteres Protein die Bindung vermittelt (siehe Abbildung 67).

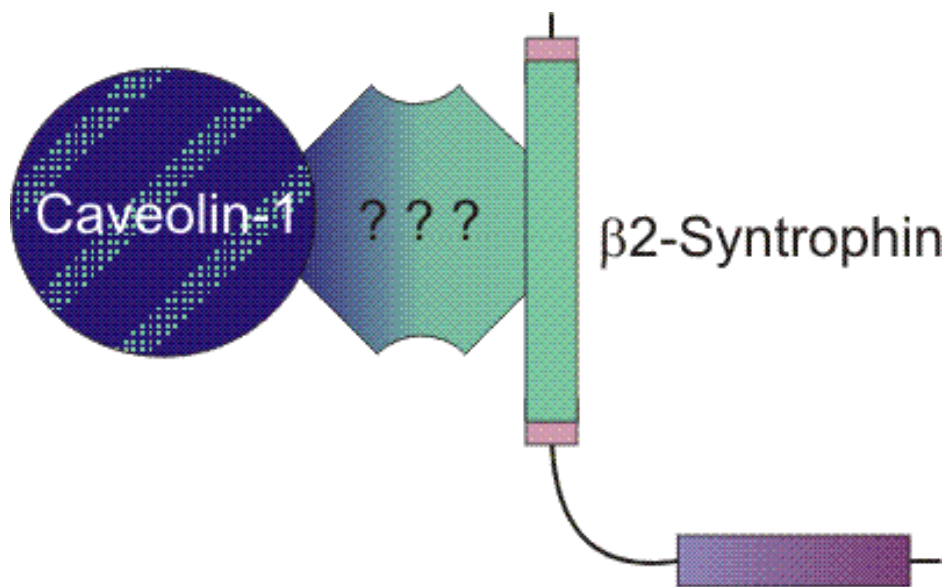


Abbildung 67: SNTB2 bindet entweder direkt oder über ein weiteres noch unbekanntes Protein/Lipid an Caveolin-1 (nach [71]).

#### 4.3.1 Komplexbildung mit Utrophin

Die Bindung von SNTB2 an Utrophin wurde bereits mehrfach beschrieben und spielt eine Rolle in der Insulinfreisetzung [63, 69, 72]. SNTB2 bindet über seine C-terminale PH und SU Domäne an Utrophin, welches dann wiederum an Actin binden und so als Verankerungskomplex dienen kann [62]. Es ist bekannt, dass die Ausbildung des Fettgewebes einer exzessiven Umgestaltung der extrazellulären Matrix (ECM) und des Zytoskeletts bedarf [119-121]. Als direktes Bindeglied zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der ECM wird neben Dystrophin auch das als „Dystrophin-Like“ Protein bezeichnete Utrophin angesehen [122].

Eine direkte Interaktion von Utrophin mit SNTB2 wurde bisher im Fettgewebe noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit konnte nun auch die Bindung von Utrophin an SNTB2 in Präadipozyten und reifen Adipozyten bestätigt werden. Um die Funktion von Utrophin in Adipozyten genauer zu untersuchen, wurden 3T3-L1 Zellen mit Utrophin siRNA transfiziert. Diese Zellen zeigten deutliche morphologische Veränderungen. Ähnlich dem Knockdown von SNTB2 bildeten die mit Utrophin siRNA behandelten Zellen größere Lipidtropfen aus und speicherten weniger Triglyzeride. SNTB2 war ebenfalls stark erniedrigt zu finden. Daher ist es wahrscheinlich, dass Utrophin SNTB2 stabilisiert und die Ausbildung der großen Lipidtropfen eine Folge der Verminderung von SNTB2 ist. Der Knockdown von SNTB2 hingegen hatte, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Utrophin Proteinexpression.

Somit wurde erstmals in dieser Arbeit eine Funktion von Utrophin in Adipozyten nachgewiesen. Die Verminderung von Utrophin während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen bewirkte die Ausbildung großer Lipidtropfen und eine geringere TG Speicherung was sich durch die stark verringerte Expression von SNTB2 erklären lässt.

#### **4.3.2 Caveolin-1 als neuer Interaktionspartner von SNTB2 in Adipozyten**

Caveolin-1 und Caveolae spielen eine essentielle Rolle in vielen Aspekten der Biologie der Zelle, wie dem Vesikeltransport, der Cholesterinhomeostase und der Weiterleitung von Signalen [123]. In der Glukosehomeostase übt Caveolin-1 eine weitere entscheidende Rolle aus, indem es die Degradation des Insulin Rezeptors und des GLUT4 verhindert [31, 34-35] und somit zur Insulinsensitivität beiträgt. Caveolin-1 kann ebenfalls von der Zelloberfläche zum intrazellulären Lipidtropfen geleitet werden [32]. Dies geschieht durch Beladung der Zellen mit Lipiden. Am Lipidtropfen reguliert Caveolin-1 sowohl die Biogenese als auch den Metabolismus dieser Organelle [123]. Durch eine direkte Bindung von Caveolin-1 an den  $\beta_3$ adrenergen Rezeptor kann die Lipolyse der Zelle reguliert werden [124]. Caveolin-1 defiziente Mäuse sind dünn, resistent gegenüber Diät-induzierter Adipositas und zeigen Störungen in der Fettmorphologie [125]. Als Interaktionspartner von SNTB2 wurde Caveolin-1 mittels Koimmunpräzipitation identifiziert. Der Knockdown von Caveolin-1 selbst führte ähnlich des Knockdowns von SNTB2 zur reduzierten Speicherung von Triglyzeriden und Cholesterin und der Ausbildung großer Lipidtropfen in den Zellen.

In den Caveolin-1 defizienten Mäusen ist bekannt, dass diese Mäuse resistent gegen Adipositas sind. Das Unvermögen der Caveolin-1  $-/-$  Mäuse adäquat Lipide in Form von Lipidtropfen zu speichern führt zu den beobachteten Störungen [125]. Dies könnte ein Grund

für die Unfähigkeit der Zellen mit Caveolin-1 Knockdown sein vergleichbare Mengen an Lipiden zu speichern wie die entsprechenden Kontrollzellen. Darüber hinaus führte der Knockdown in den 3T3-L1 Zellen zur Induktion der SNTB2 Proteinexpression.

Caveolin-1 lag hingegen in den Adipozyten mit SNTB2 Knockdown reduziert vor. Ähnlich zeigte sich auch in der SNTB2  $-/-$  Maus eine Reduktion der Caveolin-1 Proteinexpression im subkutanen und perirenal Fettgewebe. Eine Hypertrophie der Adipozyten fand sich genau in diesen beiden Fettdepots. Daraus kann gefolgert werden, dass der Utrophin-SNTB2-Caveolin-1 Komplex Caveolin-1 stabilisiert und die großen Lipidtropfen auf die verminderte Expression von Caveolin-1 zurückzuführen sind.

Des Weiteren waren die cAMP-Spiegel in allen Fettdepots der SNTB2 defizienten Mäuse, mit Ausnahme des braunen Fettgewebes, reduziert. Es ist bekannt, dass der Caveolin-1 Knockdown zu erniedrigten cAMP-Spiegeln führt [124]. Im Fettgewebe könnte das reduzierte Caveolin-1 eine Erklärung für die reduzierten cAMP-Spiegel liefern.

#### **4.3.2.1 Caveolin-1 in den Lebern der SNTB2 $-/-$ Tiere**

In der Leber wird Caveolin-1 von Hepatozyten und den Zellen der Gallengänge exprimiert [126]. In den SNTB2  $-/-$  Mäusen war die Expression von Caveolin-1 in den Lebern allerdings nicht wie im Fettgewebe verringert. Caveolin-1 war hier vermehrt zu finden. Dies lag im Einklang mit der Erhöhung der GLUT4 Proteinexpression, da Caveolin-1 den Glukose Transporter stabilisiert [35]. Die reduzierten Glukosespiegel im Serum könnten auf die induzierten Caveolin-1 Mengen zurückzuführen sein. In der Caveolin-1  $-/-$  Maus wurde bereits beschrieben, dass die Defizienz zur Erhöhung der Glukoneogenese führt und somit zu einem erhöhten Serumspiegel von Glukose [127]. Eine Assoziation der Erhöhung der Caveolin-1 Expression und einer damit einhergehenden Verbesserung der Glukosehomeostase und Insulinsensitivität durch die erhöhte insulininduzierte Glukoseaufnahme wurde bereits in Adipozyten beschrieben [128]. Allerdings zeigten die SNTB2  $-/-$  Mäuse auf Kontrolldiät keine reduzierten Serumglukosespiegel (Daten von Dr. Markus Neumeier, bisher nicht veröffentlicht), sondern bildeten nach Hochfettdiät weniger Hyperglykämie als die Wildtyp Tiere aus. Ebenso zeigten die Tiere auch im Falle der Hochfettdiät keine höhere Steatose und Fibrose als die Wildtyp Tiere, da keine vermehrten Fibrostrukturen mittels Sirius Red Färbung deutlich wurden und auch die Fibrosemarker  $\alpha$ SMA und Col1A1 auf mRNA-Ebene nicht hochreguliert waren. Eine Erhöhung der Caveolin-1 Expression in den SNTB2  $-/-$



Mäusen war nicht mit einer Leberentzündung assoziiert. Dies spricht erneut für eine höhere Stoffwechselrate der SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse.

Immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die aus Publikationen bekannte Lokalisation von Caveolin-1 in den Zellen der Gallenkanäle und Hepatozyten [126]. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen. In den Wildtyp Tieren färbte der Caveolin-1 Antikörper beinahe ausschließlich die Gallengangszellen an, während in den SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäuse auch die Hepatozyten stark gefärbt waren. In den Lebern scheint die Defizienz von SNTB2 andere Effekte auszuüben als in den Fettdepots. Da SNTB2 in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen und Interaktionspartner hat [63, 72, 76], ist eine Interaktion von SNTB2 mit Caveolin-1 in den Lebern eher unwahrscheinlich. Koimmunpräzipitationsversuche könnten hepatische Interaktionspartner aufdecken und so die Rolle von SNTB2 in der Leber genauer definieren.

#### **4.4 SNTB2 in der ob/ob Maus**

Die ob/ob Maus stellt ein genetisches Tiermodell der Adipositas dar. Die Mutation im Gen für Leptin führt zu starker Hyperphagie und vermindertem Energieumsatz und resultiert in einer ausgeprägten Adipositas [129]. Dies spiegelt sich deutlich in dem erhöhten Körpergewicht, der ausgeprägten systemischen Hyperlipidämie und den stark vermehrt gespeicherten Lipiden in den Geweben wie Fett und Leber wieder. Da das weiße Fettgewebe in den ob/ob Mäusen nicht mehr in der Lage ist die erhöhten Lipidmengen zu speichern, werden auch in peripheren Geweben Triglyzeride und Cholesterin eingelagert. In den Lebern finden sich erhöhte Mengen gespeicherter Lipide und auch das braune Fettgewebe zeigte eher die Morphologie von weißen Fettdepots. Somit war auch UCP-1 erniedrigt in den Fettdepots der ob/ob Mäuse zu finden, da sich das braune Fettgewebe vermehrt in weißes umgewandelt hatte. SNTB2 war auf Proteinebene in allen weißen Fettdepots und den Lebern der ob/ob Mäuse induziert. Auf mRNA-Ebene war SNTB2 ebenfalls in den Lebern und in allen Fettgeweben erhöht. Die Defizienz von SNTB2 führte zur Reduktion der Fettgewebssmasse, während die Induktion der Fettabbildung auch mit einer Erhöhung der SNTB2 Expression einherging. Die Expression von Caveolin-1 war, wie in den SNTB2 <sup>-/-</sup> Mäusen, nur im subkutanen und perirenal Fettgewebe reguliert. Die Defizienz von SNTB2 führte zur Reduktion der Proteinexpression von Caveolin-1 im subkutanen und perirenal Fettgewebe, während in der ob/ob Maus äquivalent mit der induzierten SNTB2 Proteinexpression auch Caveolin-1 im subkutanen und

---

perirenenalen Fettgewebe erhöht war. In den Lebern der ob/ob Mäuse war Caveolin-1 nicht verändert.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von SNTB2 in Adipozyten zu beleuchten. Als molekulares Adapterprotein wurde SNTB2 bisher vorrangig im Muskel untersucht, wenngleich in dieser Arbeit deutlich wurde, dass die Expression von SNTB2 in den verschiedenen Fettdepots ausgeprägter war. Das Fettgewebe scheint neben dem Muskel, der Milz und der Leber die Hauptquelle der SNTB2 Expression zu sein. Hier sind es vor allem die Adipozyten, die SNTB2 exprimieren und weniger die Zellen der stroma-vaskulären Fraktion. Die Funktion von SNTB2 stellt sich hauptsächlich in der Regulation der Morphologie der Lipidtropfen dar, da sowohl in den in vitro Versuchen, welche mittels der Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 und isolierten primären humanen Präadipozyten durchgeführt worden sind, als auch in den SNTB2 defizienten Mäusen keine weiteren deutlichen Veränderungen sichtbar wurden. Die metabolische Charakterisierung der SNTB2  $-/-$  Mäuse zeigt, dass die Defizienz von SNTB2 zu keiner Insulinresistenz, keiner erhöhten Entzündung oder Hyperglykämie führt. Allerdings befanden sich im Fettgewebe der SNTB2  $-/-$  Mäuse weniger Adipozyten, diese waren hypertroph. Auch in den 3T3-L1 Zellen, welche als Präadipozyten mit SNTB2 siRNA transfiziert und anschließend differenziert wurden, bildeten sich größere Lipidtropfen aus. In den noch teilungsfähigen 3T3-L1 Präadipozyten führte der Knockdown von SNTB2 zu einer verringerten Proliferation, sodass dieses verminderte Proliferationspotential der Fibroblasten eine Erklärung für die reduzierte Anzahl an Adipozyten in den Mäusen darstellen könnte. SNTB2 könnte somit eine Rolle in der Regulation der Proliferation der Adipozyten und der Fusion von Lipidtropfen haben, da die beobachteten großen Lipidtropfen üblicherweise durch die Fusion kleinerer Tropfen gebildet werden. Obwohl die Adipozyten durch den Knockdown von SNTB2 hypertroph geworden sind, war die Lipolyseaktivität und die zusätzliche Speicherung von freien Fettsäuren nicht gestört.

Untersuchungen der Interaktionspartner konnten weitere Einblicke in die Funktion von SNTB2 liefern. Zwar konnte an Hand der Immunfluoreszenzfärbungen SNTB2 nicht auf ein bestimmtes Kompartiment begrenzt werden, jedoch fand sich SNTB2 in Fibroblasten in vesikelförmigen und filamentartigen Strukturen, die es jetzt noch genauer zu untersuchen gilt. Als Interaktionspartner in Adipozyten konnten Utrophin und Caveolin-1 identifiziert werden. Mittels RNA-Interferenz Versuche wurde deutlich, dass Utrophin SNTB2 offenbar stabilisiert und die Ausbildung der großen Lipidtropfen in den Zellen mit Utrophin Knockdown eine Folge der Verminderung von SNTB2 ist. Die verringerte Expression von SNTB2 mittels siRNA führte ferner zur Reduktion von Caveolin-1. Auch im subkutanen und perirenenalen

Fettgewebe der SNTB2  $-/-$  Mäuse war Caveolin-1 vermindert. Genau diese beiden Fettdepots bildeten die Fettzellhypertrophie aus. In den Lebern der SNTB2  $-/-$  Mäuse war Caveolin-1 hingegen hochreguliert, sodass hier eine Interaktion von Caveolin-1 und SNTB2 eher unwahrscheinlich ist. Die Induktion von Caveolin-1 ist ein möglicher Grund für die reduzierten Glukoseserumspiegel in den SNTB2 defizienten Mäusen. Allerdings zeigten SNTB2  $-/-$  Mäuse auf Kontrolldiät keine reduzierten Serumglukosespiegel, sondern bildeten nach Hochfettdiät lediglich eine geringere Hyperglykämie als die Wildtyp Tiere aus.

Untersuchungen mit dem genetischen Tiermodell der Adipositas, die ob/ob Mäuse, zeigten eine Assoziation von SNTB2 mit der Ausbildung der Fettmasse. Während SNTB2 in den Fettgeweben und den Lebern der ob/ob Mäuse erhöht vorlag, führte die Defizienz von SNTB2 in den SNTB2  $-/-$  Mäusen zu einer verringerten Fettgewebsmasse.

In dieser Arbeit konnte somit nachgewiesen werden, dass SNTB2 eine entscheidende Rolle für die Funktionalität von Adipozyten ausübt. Die Fusion von mehreren kleineren Lipidtropfen zu einer großen Vakuole scheint über die Expression von SNTB2 reguliert zu werden, da eine Verringerung von SNTB2 augenscheinlich die Fusion begünstigt.

## 6 Publikationen und Kongressbeiträge

### 6.1 Publikationen

#### 6.1.1 Erstautorenschaften

Neumeier M\*, **Bauer S\***, Brühl H, Eisinger K, Kopp A, Abke S, Walter R, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin stimulates release of CCL2, -3, -4 and -5 while the surface abundance of CCR2 and -5 is simultaneously reduced in primary human monocytes. *Cytokine* 2011; 56(3):573-80.

**Bauer S**, Weiss TS, Wiest R, Schacherer D, Hellerbrand C, Farkas S, Scherer MN, Ritter M, Schmitz G, Schäffler A, Buechler C: Soluble CD163 is not increased in visceral fat and steatotic liver and is even suppressed by free fatty acids in vivo. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(3):733-9.

**Bauer S**, Wanninger J, Schmidhofer S, Weigert J, Neumeier M, Dorn C, Hellerbrand C, Zimara N, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. *Endocrinology* 2011; 152(1):26-35.

**Bauer S**, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Weigert J, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Elevated free fatty acids and impaired adiponectin bioactivity contribute to reduced SOD2 protein in monocytes of type 2 diabetes patients. *Exp Mol Pathol* 2011; 90(1):101-6.

**Bauer S**, Neumeier M, Wanninger J, Walter R, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Buechler C: Systemic resistin is increased in type 2 diabetic patients treated with loop diuretics. *J Diabetes Complications* 2011; 25(6):377-81.

**Bauer S**, Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Schäffler A, Luchner A, Schnitzbauer AA, Aslanidis C, Buechler C: Low-abundant adiponectin receptors in visceral adipose tissue of humans and rats are further reduced in diabetic animals. *Arch Med Res* 2010; 41(2):75-82.

### 6.1.2 Koautorenschaften

Wanninger J, Liebisch G, Schmitz G, **Bauer S**, Eisinger K, Neumeier M, Schäffler A, Ouchi N, Walsh K, Buechler C: Lipidomic analysis of the liver identifies changes of major lipid species in adiponectin deficient mice. *Exp Mol Pathol* 2012; Epub ahead of print.

Wanninger J, **Bauer S**, Eisinger K, Weiss TS, Walter R, Hellerbrand C, Schäffler A, Higuchi A, Walsh K, Buechler C: Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349(2):248-54.

Eisinger K, **Bauer S**, Schäffler A, Walter R, Neumann E, Buechler C, Müller-Ladner U, Frommer KW: Chemerin induces CCL2 and TRL4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Exp Mol Pathol* 2012; 92(1):90-6.

Walter R, Wanninger J, **Bauer S**, Eisinger K, Neumeier M, Weiss TS, Amann T, Hellerbrand C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Adiponectin reduces connective tissue growth factor in human hepatocytes which is already induced in non-fibrotic non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(3):740-4.

Wanninger J, Walter R, **Bauer S**, Eisinger K, Schäffler A, Dorn C, Weiss TS, Hellerbrand C, Buechler C: MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(2):603-7.

Wanninger J, Weigert J, Wiest R, **Bauer S**, Karrasch T, Farkas S, Scherer MN, Walter R, Weiss TS, Hellerbrand C, Neumeier M, Schäffler A, Buechler C: Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. *Cytokine* 2011; 55(3):435-40.

Wanninger J, Neumeier M, **Bauer S**, Weiss TS, Eisinger K, Walter R, Dorn C, Hellerbrand C, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin induces the transforming growth factor decoy receptor BAMBI in human hepatocytes. *FEBS Lett* 2011; 585(9):1338-44.

Buechler C, **Bauer S**: ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) associated proteins: potential drug targets in the metabolic syndrome and atherosclerotic disease? *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(2):319-30.

Wanninger J, Wiest R, **Bauer S**, Neumeier M, Eisinger K, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Buechler C: Portal levels of latent transforming growth factor- $\beta$  are related to liver function in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23(3):218-23.

Wanninger J, Neumeier M, Hellerbrand C, Schacherer D, **Bauer S**, Weiss TS, Huber H, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Lipid accumulation impairs adiponectin-mediated induction of activin A by increasing TGF $\beta$  in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811(10):626-33.

Wiest R, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, **Bauer S**, Schmidhofer S, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine* 2011; 53(2):178-83.

Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, **Bauer S**, Farkas S, Scherer MN, Schnitzbauer A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(3):1404-11.

Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, **Bauer S**, Aslanidis C, Rogler G, Ott C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(4):630-7.

Wanninger J, Neumeier M, Weigert J, **Bauer S**, Weiss TS, Schäffler A, Krempf C, Bleyl C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF- $\kappa$ B, and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297(3):G611-8.

Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, **Bauer S**, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72(3):342-8.

Weigert J, Neumeier M, **Bauer S**, Mages W, Schnitzbauer AA, Obed A, Gröschl B, Hartmann A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett* 2008; 582(19):2965-72.

## 6.2 Kongressbeiträge

### 6.2.1 Vorträge

**Bauer S**, Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bollheimer C, Büttner R, Schäffler A, Luchner A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Hyperlipidemia but not hyperglycemia is associated with elevated superoxide dismutase 2 in the visceral fat of rats.

11th annual meeting Young Active Research, Munich, 02.-04.10.2009

**Bauer S**, Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Knock down of beta 2 syntrophin in adipocytes impairs lipid storage and lipolysis.

Forschungswochenende/Summer School der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Velburg-Lendenfeld, 09.-10.10.2009

**Bauer S**, Neumeier M, Eisinger K, Kopp A, Aslanidis C, Schäffler A, Schölmerich J, Salzberger B, Adams ME, Froehner SC, Buechler Christa: Adipocyte hypertrophy and non-alcoholic steatohepatitis in beta 2 syntrophin deficient mice on a high fat diet.

34th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 05.-08.09.2011

**Bauer S**, Neumeier M, Eisinger K, Kopp A, Aslanidis C, Schäffler A, Schölmerich J, Salzberger B, Adams ME, Froehner SC, Buechler Christa: Adipocyte hypertrophy and non-alcoholic steatohepatitis in beta 2 syntrophin deficient mice on a high fat diet.

Summer School of the Biomedicine Section, Regen, 04.-05.11.2011



### 6.2.2 Poster

**Bauer S**, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Buechler C: Elevated free fatty acids and low adiponectin may explain reduced SOD2 protein in type 2 diabetic monocytes.

53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Leipzig, 03.-06.03.2010

**Bauer S**, Wanninger J, Schmidhofer S, Weigert J, Neumeier M, Dorn C, Hellerbrand C, Zimara N, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Cholesterol shortage secondary to excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes.

33rd European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 06.-09.09.2010

**Bauer S**, Eisinger K, Neumeier M, Schmidhofer S, Walter R, Wanninger J, Kopp A, Adams ME, Aslanidis C, Buechler C: Function of beta 2 syntrophin in adipocytes.

Summer School of the Biomed Department and rer. physiol. Students, Regen, 12.-13.11.2010

Best Poster Prize

**Bauer S**, Eisinger K, Neumeier M, Walter R, Kopp A, Adams ME, Froehner SC, Aslanidis C, Buechler Christa: Adipocyte hypertrophy and non-alcoholic steatohepatitis in beta 2 syntrophin deficient mice on a high fat diet.

1st International Conference on ImmunoMetabolism, Kreta, 18.-23.09.2011

**Bauer S**, Eisinger K, Neumeier M, Walter R, Kopp A, Adams ME, Froehner SC, Aslanidis C, Buechler Christa: Adipocyte hypertrophy and non-alcoholic steatohepatitis in beta 2 syntrophin deficient mice on a high fat diet.

72nd Scientific Sessions – American Diabetes Association, Philadelphia, 08.-12.06.2012

### **Danksagung**

An dieser Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Frau Prof. Dr. Christa Büchler für die großartige Betreuung dieser Arbeit, die vielen ausführlichen Diskussionen, das Beisteuern vieler Ideen zu dieser Arbeit, das Korrekturlesen, das Erstellen des Erstgutachtens, die Bereitschaft den Erstprüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen und für Vieles mehr.

Bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung, das Korrekturlesen dieser Arbeit, die Erstellung des Zweitgutachtens und die Bereitschaft den Zweitprüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Fleck bedanke ich mich für die hilfreichen Ratschläge und die Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth möchte ich mich dafür bedanken, dass er den Vorsitz des Prüfungsausschusses übernimmt.

Bei Herrn Prof. Dr. Gernot Längst bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft den dritten Prüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Vielen Dank an meine tollen Kollegen, Dr. Markus Neumeier, Kristina Eisinger, Yvonne Hader, Tanja Späth, Dr. Andrea Kopp, Kerstin Neumeier, Dr. Margarita Bala, Dr. Thomas Karrasch, Andreas Schmid, Dr. Alexander Sigrüner und allen Praktikanten und Bachelors. Eure Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Freundschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vor allem möchte ich mich nochmal gesondert bei Kristina, Yvonne und Tanja bedanken. Ihr habt mir unheimlich weitergeholfen und seid ein großartiges Team. Danke Markus für deine Freundschaft, Aufmunterungen und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft. Vielen Dank Andrea für die Unterstützung im Labor und auf Kongressen (mit dir waren alle Kongresse großartig) und danke für deine tolle Freundschaft.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre ständige und uneingeschränkte Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, ohne die das ganze nicht möglich gewesen wäre. Vor allem meinem Freund Florian, der mich immer wieder aufgemuntert und unterstützt hat, möchte ich danken. Danke Marco und Marlene für die

tollen Zeiten in Würzburg. Vielen Dank an meine Freunde Jo, Christoph, Stephe, Nina, Kristin, Chris, Tesi, Sandra, Bine, Rico, Wolfgang, Mario, Sara und viele mehr. Danke, dass ihr alle immer für mich dagewesen seid.

Diese Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung der DFG durchgeführt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hirsch, J. and B. Batchelor, *Adipose tissue cellularity in human obesity*. Clin Endocrinol Metab, 1976. **5**(2): p. 299-311.
2. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
3. Arner, P. and K.L. Spalding, *Fat cell turnover in humans*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 101-4.
4. Rosen, E.D. and O.A. MacDougald, *Adipocyte differentiation from the inside out*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 885-96.
5. Lane, M.D. and Q.Q. Tang, *From multipotent stem cell to adipocyte*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005. **73**(7): p. 476-7.
6. Otto, T.C. and M.D. Lane, *Adipose development: from stem cell to adipocyte*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2005. **40**(4): p. 229-42.
7. Dani, C., *Embryonic stem cell-derived adipogenesis*. Cells Tissues Organs, 1999. **165**(3-4): p. 173-80.
8. Park, K.W., D.S. Halperin, and P. Tontonoz, *Before they were fat: adipocyte progenitors*. Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 454-7.
9. Timmons, J.A., et al., *Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4401-6.
10. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-7.
11. Cinti, S., *Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(5): p. E977-86.
12. Schaffler, A., et al., *Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases*. Endocr Rev, 2006. **27**(5): p. 449-67.
13. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
14. Wang, Y. and H.S. Sul, *Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 287-302.
15. Kim, J.B., et al., *ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4333-7.
16. White, U.A. and J.M. Stephens, *Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **318**(1-2): p. 10-4.
17. Eberle, D., et al., *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 839-48.
18. Hagen, R.M., S. Rodriguez-Cuenca, and A. Vidal-Puig, *An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2689-98.
19. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2547-59.
20. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-9.
21. Thiele, C. and J. Spandl, *Cell biology of lipid droplets*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(4): p. 378-85.
22. Brown, D.A., *Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat*. Curr Biol, 2001. **11**(11): p. R446-9.

- 
23. Robenek, H., et al., *Topography of lipid droplet-associated proteins: insights from freeze-fracture replica immunogold labeling*. J Lipids, 2011. **2011**: p. 409371.
  24. Hommel, A., et al., *The ARF-like GTPase ARFRP1 is essential for lipid droplet growth and is involved in the regulation of lipolysis*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(5): p. 1231-42.
  25. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 419-40.
  26. Nishino, N., et al., *FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2808-21.
  27. Puri, V., et al., *Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7833-8.
  28. Blouin, C.M., et al., *Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects*. J Lipid Res, 2010. **51**(5): p. 945-56.
  29. Ostermeyer, A.G., et al., *Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets*. J Cell Biol, 2001. **152**(5): p. 1071-8.
  30. Parton, R.G., *Caveolae and caveolins*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 542-8.
  31. Gonzalez-Munoz, E., et al., *Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes*. Endocrinology, 2009. **150**(8): p. 3493-502.
  32. Le Lay, S., et al., *Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis*. Traffic, 2006. **7**(5): p. 549-61.
  33. Nystrom, F.H., et al., *Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(12): p. 2013-24.
  34. Yamamoto, M., et al., *Caveolin is an activator of insulin receptor signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26962-8.
  35. Karlsson, M., et al., *Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes*. FASEB J, 2002. **16**(2): p. 249-51.
  36. Vigouroux, C., et al., *Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(6): p. 862-76.
  37. Lass, A., et al., *Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores*. Prog Lipid Res, 2011. **50**(1): p. 14-27.
  38. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
  39. Haemmerle, G., et al., *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4806-15.
  40. Osuga, J., et al., *Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 787-92.
  41. Karlsson, M., et al., *cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27218-23.
  42. Zechner, R., et al., *FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 279-91.

- 
43. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1233-60.
  44. Armani, A., et al., *Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 564-72.
  45. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
  46. Cook, A. and C. Cowan, *Adipose*. 2008.
  47. Frayn, K.N., *Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux*. Diabetologia, 2002. **45**(9): p. 1201-10.
  48. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance*. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.
  49. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* Diabetes Care, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
  50. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
  51. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
  52. Aron-Wisnewsky, J., et al., *Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4619-23.
  53. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buchler, *Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(6): p. 273-80.
  54. Suganami, T., et al., *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 84-91.
  55. Unger, R.H., *Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5159-65.
  56. Bauer, S., et al., *Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 26-35.
  57. Hajer, G.R., T.W. van Haeften, and F.L. Visseren, *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*. Eur Heart J, 2008. **29**(24): p. 2959-71.
  58. Bauer, S., et al., *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP2) Activation after Excess Triglyceride Storage Induces Chemerin in Hypertrophic Adipocytes*. Endocrinology, 2010.
  59. Le Lay, S., P. Ferre, and I. Dugail, *Adipocyte cholesterol balance in obesity*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 1): p. 103-6.
  60. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(6): p. E1151-60.
  61. Alessi, A., et al., *gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins*. Exp Cell Res, 2006. **312**(16): p. 3084-95.
  62. Adams, M.E., et al., *Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25859-65.
  63. Buechler, C., et al., *The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(2): p. 759-65.

- 
64. Chockalingam, P.S., S.H. Gee, and H.W. Jarrett, *Pleckstrin homology domain 1 of mouse alpha 1-syntrophin binds phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Biochemistry, 1999. **38**(17): p. 5596-602.
  65. Yan, J., et al., *Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin*. EMBO J, 2005. **24**(23): p. 3985-95.
  66. Adams, M.E., et al., *Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution*. Neuron, 1993. **11**(3): p. 531-40.
  67. Worton, R.G. and A.H. Burghes, *Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Int Rev Neurobiol, 1988. **29**: p. 1-76.
  68. Zubrzycka-Gaarn, E.E., et al., *The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle*. Nature, 1988. **333**(6172): p. 466-9.
  69. Trajkovski, M., et al., *Regulation of insulin granule turnover in pancreatic beta-cells by cleaved ICA512*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33719-29.
  70. Trajkovski, M., et al., *Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in {beta}-cells*. J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1063-74.
  71. Bared, S.M., *Identification and Characterization of ABCA1-Interactive Proteins and Their Relevance to Atherosclerosis*, in *Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2005, University of Regensburg: Regensburg.
  72. Ort, T., et al., *The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(9): p. 621-30.
  73. Schubert, S., et al., *beta2-Syntrophin is a Cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12929.
  74. Bauer, S., *Die Rolle von alpha- und beta 2-Syntrophin im Fettgewebe und in Adipozyten*, in *Department of Internal Medicine I*. 2008, University of Regensburg: Regensburg.
  75. Guo, Y., et al., *Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 657-61.
  76. Lumeng, C., et al., *Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases*. Nat Neurosci, 1999. **2**(7): p. 611-7.
  77. Neumeier, M., *Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren und Untersuchungen zur Adiponectin-induzierten Genexpression in Hepatozyten*, in *Department of Internal Medicine I*. 2008, University of Regensburg: Regensburg.
  78. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
  79. Green, H. and O. Kehinde, *An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion*. Cell, 1975. **5**(1): p. 19-27.
  80. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
  81. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
  82. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
  83. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

- 
84. Heukeshoven, J. and R. Dernick, *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 1988. **9**(1): p. 28-32.
  85. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
  86. van Harmelen, V., T. Skurk, and H. Hauner, *Primary culture and differentiation of human adipocyte precursor cells*. Methods Mol Med, 2005. **107**: p. 125-35.
  87. Poulain-Godefroy, O. and P. Froguel, *Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 662-7.
  88. Schaffler, A., et al., *Role of specificity protein-1, PPARgamma, and pituitary protein transcription factor-1 in transcriptional regulation of the murine CORS-26 promoter*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1678**(2-3): p. 150-6.
  89. Spiegelman, B.M., M. Frank, and H. Green, *Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 10083-9.
  90. Weigert, J., et al., *Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release*. FEBS Lett, 2008. **582**(19): p. 2965-72.
  91. Boizard, M., et al., *Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 29164-71.
  92. Wang, X.M., et al., *The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3809-18.
  93. Gregoire, F., et al., *The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture*. Biol Cell, 1990. **69**(3): p. 215-22.
  94. Cushman, S.W., *Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell*. J Cell Biol, 1970. **46**(2): p. 326-41.
  95. Simonsen, A., et al., *EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 494-8.
  96. Gaullier, J.M., et al., *FYVE fingers bind PtdIns(3)P*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 432-3.
  97. Eskelinen, E.L., *Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(5-6): p. 495-502.
  98. Levine, T., *Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(9): p. 483-90.
  99. Haenggi, T. and J.M. Fritschy, *Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1614-31.
  100. Cingolani, L.A. and Y. Goda, *Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(5): p. 344-56.
  101. Kim, M.J., et al., *alpha-Syntrophin is required for the hepatocyte growth factor-induced migration of cultured myoblasts*. Exp Cell Res, 2011. **317**(20): p. 2914-24.
  102. Kim, M.J., et al., *Alpha-syntrophin modulates myogenin expression in differentiating myoblasts*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15355.
  103. Trayhurn, P., *Adipocyte biology*. Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 41-4.



- 
104. Taube, A., et al., *Inflammation and Metabolic Dysfunction: Links to Cardiovascular Disease*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012.
  105. Lagathu, C., et al., *Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(12): p. 1695-705.
  106. Kamei, N., et al., *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26602-14.
  107. Suganami, T. and Y. Ogawa, *Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 33-9.
  108. Baranowski, M., et al., *Dietary flaxseed oil reduces adipocyte size, adipose monocyte chemoattractant protein-1 levels and T-cell infiltration in obese, insulin-resistant rats*. Cytokine, 2012.
  109. Laurencikienė, J., et al., *Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(12): p. E2045-9.
  110. Yu, B.L., S.P. Zhao, and J.R. Hu, *Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity*. Obes Rev, 2010. **11**(8): p. 560-7.
  111. Okuhira, K., et al., *Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta1-syntrophin in cholesterol efflux*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39653-64.
  112. Voshol, P.J., et al., *Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 479-85.
  113. Schmid, B., et al., *Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(4): p. 1073-82.
  114. Robenek, H., et al., *Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 20): p. 4215-24.
  115. Rossmeisl, M., et al., *Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo*. Eur J Biochem, 2002. **269**(1): p. 19-28.
  116. Schwenk, R.W., et al., *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 149-54.
  117. Wilde, A.A. and R. Brugada, *Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel*. Circ Res, 2011. **108**(7): p. 884-97.
  118. Venema, V.J., et al., *Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28187-90.
  119. Romo-Yanez, J., C. Montanez, and L.A. Salazar-Olivo, *Dystrophins and DAPs are expressed in adipose tissue and are regulated by adipogenesis and extracellular matrix*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(2): p. 717-22.
  120. Mariman, E.C. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(8): p. 1277-92.
  121. Takenouchi, T., et al., *Role of caveolin-1 and cytoskeletal proteins, actin and vimentin, in adipogenesis of bovine intramuscular preadipocyte cells*. Cell Biol Int, 2004. **28**(8-9): p. 615-23.
  122. Zuellig, R.A., et al., *Tissue expression and actin binding of a novel N-terminal utrophin isoform*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 904547.
  123. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1261-70.

- 
124. Sato, M., et al., *Interaction with caveolin-1 modulates G protein coupling of the mouse beta3-adrenoceptor*. J Biol Chem, 2012.
  125. Razani, B., et al., *Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8635-47.
  126. Ogi, M., et al., *Distribution and localization of caveolin-1 in sinusoidal cells in rat liver*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 33-40.
  127. Asterholm, I.W., et al., *Altered mitochondrial function and metabolic inflexibility associated with loss of caveolin-1*. Cell Metab, 2012. **15**(2): p. 171-85.
  128. Trajkovski, M., et al., *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 649-53.
  129. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.